

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

---

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

POUR L'OBTENTION

DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
(Doctorat d'Etat)

PAR

**HENRI RENAULT**

*Pharmacien des Hôpitaux  
Licencié ès-Sciences*

---

## 1<sup>re</sup> THÈSE

ÉTUDE CRITIQUE DE QUELQUES MÉTHODES NÉPHÉLÉMETRIQUES ET COLORIMÉTRIQUES,  
APPLIQUÉES A LA MICRO-ANALYSE BIOLOGIQUE

## 2<sup>e</sup> THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

*soutenues le 29 Novembre 1948 devant la Commission d'Examen*

---

MM. P. FLEURY, *Président*

M. GUILLOT, *Professeur*

J. COURTOIS, *Maître de Conférences*



CENTRE DE DOCUMENTATION UNIVERSITAIRE

TOURNIER & CONSTANS

5, Place de la Sorbonne, 5

PARIS-V<sup>e</sup>

1950



à Monsieur le Professeur R. FABRE  
Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris  
Membre de l'Académie de Médecine  
Pharmacien des Hopitaux  
Hommage de notre respectueux attachement

à à Monsieur le Professeur FLEURY  
Pharmacien des Hopitaux psychiatriques  
qui nous a fait l'honneur de présider  
le Jury de cette thèse

à Monsieur le Professeur GUILLOT  
Pharmacien des Hopitaux  
en témoignage de notre affectueuse reconnaissance

à Monsieur J. COURTOIS  
Maître de Conférences à la Faculté  
Pharmacien des Hôpitaux  
qui nous a fait l'honneur de faire  
partie de notre Jury

à ma Faculté

à mes Amis



## INTRODUCTION

Parallèlement au développement de la biochimie générale, de la chimie physiologique, la biologie clinique a pris au cours de ces dernières années un essor considérable dans chacun de ses différents domaines bactériologie, sérologie, anatomie pathologique, hématologie et surtout chimie biologique.

Ce développement rapide est dû à la fois, à l'intérêt croissant que présentent pour le médecin les résultats des examens de laboratoire, et au perfectionnement des méthodes analytiques. Le médecin demande au laboratoire, non seulement de confirmer un diagnostic, de l'éclairer en présence d'un syndrome mal défini, d'un tableau clinique peu net, mais encore de suivre l'évolution de la maladie, afin de préciser la valeur d'une thérapeutique.

Les demandes d'examens de plus en plus nombreuses, - les statistiques de nos laboratoires hospitaliers en témoignent, - ont nécessité un perfectionnement continu des techniques. A côté des méthodes pondérales et volumétriques habituelles se sont développées les méthodes colorimétriques et turbidimétriques.

La micro-analyse biologique devait amener un développement important de ces deux derniers groupes de méthodes. Parallèlement à la mise au point des techniques, les appareils se sont perfectionnés. Il en est résulté des améliorations considérables, mais aussi une certaine confusion pour celui qui, devant un problème particulier à résoudre, se trouve en face d'une multiplicité de techniques et d'appareils, entre lesquels un choix est souvent délicat.

Le but de ce travail est d'appliquer, dans nos services hospitaliers et plus particulièrement dans les hôpitaux d'enfants, des techniques de microanalyse sanguine permettant d'éviter les prélèvements par voie veineuse.

Les méthodes proposées comprendront tantôt des techniques nouvelles, tantôt des techniques adaptées à nos besoins, tantôt des techniques adoptées purement et simplement. Dans tous les cas les résultats de ces micro-méthodes ont été comparés à ceux que fournissent les macro-méthodes correspondantes.

Nous avons été guidés dans l'élaboration et dans le choix de ces techniques par la nécessité qu'il y a d'observer un juste équilibre entre les méthodes rigoureuses exigées le plus souvent par la recherche scientifique, et les procédés empiriques qui sont à l'origine de nombreux tests, souvent utiles, mais recourant à des réactions encore mal précisées. Il fallait en outre que ces méthodes soient utilisables dans nos services hospitaliers, avec le matériel relativement simple dont nous disposons, avec le personnel habituel de nos laboratoires, internes en pharmacie, laborantines.

Ce travail a été effectué au laboratoire de chimie biologique et d'hématologie de l'hôpital Bretonneau. Il comprend trois parties :

1<sup>ère</sup> Partie : Etude théorique des méthodes - Les milieux colorés, les milieux troubles.

2<sup>ème</sup> Partie : Etude des appareils de mesure.

3<sup>ème</sup> Partie : Exposé de quelques techniques courantes.

Que Monsieur le Professeur Guillot, pharmacien des hôpitaux, qui, depuis dix ans, durant notre présence à l'hôpital Broussais en qualité d'interne puis de chef de laboratoire, et à la Faculté de Pharmacie aux travaux pratiques de Physique biologique du certificat d'études supérieures de chimie biologique, a accepté de nous guider avec tant de sollicitude et de bienveillance, trouve ici le modeste hommage de notre gratitude et de notre affectueuse reconnaissance.

Je prie Monsieur le Professeur Fleury, pharmacien des hôpitaux psychiâtriques qui a bien voulu accepter de présider le Jury de cette thèse, et/ m' accorder en toutes circonstances l'appui de ses conseils et de son exemple, de croire à ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur Courtois, maître de conférences, pharmacien des hôpitaux, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse et lui suis reconnaissant pour la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée.

-:-:-:-:-

## I<sup>ère</sup> PARTIE : ETUDE THEORIQUE DES METHODES

### LES MILIEUX COLORES - LES MILIEUX TROUBLES

#### - COLORIMETRIE -

On utilise de plus en plus fréquemment, en biologie, pour des déterminations quantitatives, la coloration propre de certaines substances ou de certains de leurs dérivés; ces méthodes colorimétriques, se prêtent bien aux dosages en série, sur des prises d'essais restreintes; toutefois, elles ont été souvent critiquées quant à la précision des résultats qu'elles fournissent. Il apparaît cependant, que si l'on a soin de préciser les meilleures conditions d'emploi de ces techniques, il est possible d'égaliser souvent la précision des autres méthodes analytiques.

A l'origine, on utilisa surtout la colorimétrie en lumière blanche; dans ce cas, on apprécie l'intensité de la coloration d'une solution de concentration inconnue, par rapport à une solution de la même substance, de titre connu.

Actuellement, à côté de la colorimétrie en lumière blanche se développent de plus en plus des méthodes utilisant l'absorption de radiations sélectionnées, parfois monochromatiques; on évalue alors, non plus les couleurs, mais le rapport de l'intensité lumineuse transmise après traversée de la solution, à l'intensité lumineuse incidente. Ces techniques, beaucoup plus sensibles et précises que les précédentes, font toutefois naître des causes d'erreurs souvent importantes, dont il est indispensable d'être averti.

#### Colorimétrie en lumière blanche

Les comparaisons "d'intensité de coloration" entre la solution à étudier et la solution étalon s'effectuent pratiquement à l'aide d'un colorimètre, (Duboscq) dont l'emploi a supplanté la méthode dite de dilution. Les deux cuves contenant respectivement la solution x et l'étalon, sont éclairées à l'aide d'un faisceau de lumière blanche bien homogène. Le pouvoir absorbant de chaque molécule colorée étant pratiquement indépendant de la concentration, on compensera par une différence d'épaisseur des couches examinées, une différence en sens inverse des concentrations. L'égalité d'intensité sera réalisée quand chacun des faisceaux rencontrera, dans un cylindre idéal, de 1 cm<sup>2</sup> de section par exemple, le même nombre de molécules colorées. On pourra donc écrire que le rapport des épaisseurs est égal au rapport inverse des concentrations :

$$\frac{c}{c'} = \frac{e'}{e} \text{ d'où } c = c' \frac{e'}{e}$$

En compensation de sa grande simplicité, les difficultés de cette méthode sont les suivantes : elle nécessite des intensités de coloration assez importantes, l'emploi constant d'un étalon; sa précision est rarement supérieure à 5 %; enfin lorsque la solution à examiner ne présente pas exactement la même teinte que la solution étalon, par suite de la présence d'une impureté colorée - cas souvent rencontré en biologie - le dosage devient difficile et imprécis, parfois même impossible.

### Colorimétrie en lumière sélectionnée

Si, au lieu d'éclairer une solution colorée à l'aide de lumière blanche, on utilise une lumière monochromatique, ou tout au moins sélectionnée, la coloration du faisceau transmis ne sera pas différente de celle du faisceau incident; il n'y aura entre eux qu'une différence d'intensité lumineuse. Si un dispositif convenable permet d'évaluer le rapport des intensités de ces deux faisceaux, un grand progrès sera réalisé sur la colorimétrie en lumière blanche. Il se traduira par un accroissement de la sensibilité (mesures possibles sur des solutions peu colorées) et de la précision, la suppression de l'étalon qui ne sera plus indispensable à chaque mesure, un étalonnage de l'appareil pouvant être fait une fois pour toutes. On pourra en outre, suivre beaucoup plus aisément des réactions colorées évoluant dans le temps (étude de la cinétique des réactions colorées).

### Lois régissant la colorimétrie en lumière sélectionnée - Modes d'expression des résultats

Deux lois régissent l'absorption de radiations monochromatiques par les solutions colorées. Si l'on représente la variation de l'intensité de la lumière transmise  $I$ , en fonction de l'intensité du faisceau incident  $I_0$ , et de l'épaisseur  $e$  de la solution traversée, on constate que  $I$  diminue exponentiellement quand  $e$  augmente. La loi de Lambert traduit cette variation :

$$I = I_0 \cdot 10^{-k \cdot e}$$

( $k$  étant une constante dépendant de la nature de la substance, de la concentration de la solution et de la longueur d'onde utilisée).

La figure 1 représente cette variation, pour une diminution d'intensité de 50 % pour 1 cm. d'épaisseur traversée. (La lumière transmise est égale à 50 % pour 1 cm, 25 % pour 2 cm, 12,5 % pour 3 cm., etc.).

Une loi identique régit la variation de  $I$  en fonction de la concentration; c'est la loi de Beer :

$$I = I_0 \cdot 10^{-h \cdot c}$$

( $h$  étant une constante dépendant de la nature de la substance, de l'épaisseur de la solution traversée et de la longueur d'onde utilisée).

Ces deux lois réunies en une seule fournissent la relation :

$$I = I_0 \cdot 10^{-K \cdot c \cdot e}$$

( $K$  ne dépendant plus que de la substance et de la radiation utilisée).

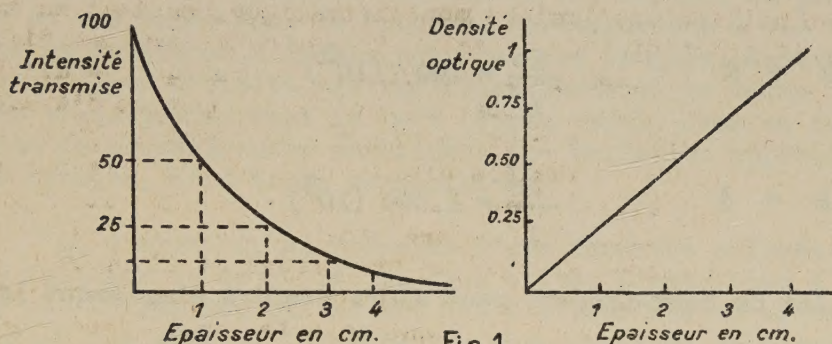


Fig.1

Ces lois s'appliquent d'une façon stricte si l'on utilise une radiation monochromatique. Si l'on emploie une bande étroite du spectre, elles ne s'appliqueront que grossièrement, d'autant mieux que la largeur de la bande sera plus étroite. Si la bande est large et, à plus forte raison en lumière blanche, elles cesseront de s'appliquer. Notons toutefois que la loi de Beer ne s'appliquera pas si la dilution provoque des modifications de l'état de la matière colorante qui ont pour effet de faire varier son spectre d'absorption.

On exprimera le pouvoir absorbant des solutions de plusieurs manières :

Le rapport de transmission  $\frac{I}{I_0} = \frac{\text{intensité transmise}}{\text{intensité incidente}}$

La densité optique est par définition le logarithme décimal

du rapport inverse :

$$D = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

ce qui revient à dire que D variera pratiquement de 0 (pas d'absorption) à 3 ou 4 au maximum, car l'intensité transmise est alors de 1/1.000 ou 1/10.000 de l'intensité incidente.

$$D = 0 \quad \frac{I_0}{I} = 1 \quad (10^0)$$

$$D = 1 \quad \frac{I_0}{I} = 10 \quad (10^1)$$

$$D = 2 \quad \frac{I_0}{I} = 100 \quad (10^2)$$

$$D = 3 \quad \frac{I_0}{I} = 1.000 \quad (10^3)$$

La loi de Beer-Lambert peut alors prendre simplement la forme :

$$D = K. c. e$$

La densité optique variera donc linéairement en fonction de la concentration *c* ou de l'épaisseur *e*.

La densité optique par unité d'épaisseur (1 cm.) est appelée : coefficient d'extinction *E*.

La densité optique par unité d'épaisseur et par unité de concentration, (une molécule gramme par litre) est appelée coefficient d'extinction moléculaire  $E_m = K$ .

On utilisera parfois le coefficient d'extinction spécifique *E<sub>s</sub>*, qui sera la densité optique d'une solution de concentration égale à 1 gramme par litre, examinée sous 1 cm. d'épaisseur.

Les valeurs de la densité optique et de ces différents coefficients dépendent évidemment de la longueur d'onde utilisée. Elles varieront pour chacune d'elles : grandes quand l'absorption sera forte, petites quand celle-ci sera faible. Il sera donc nécessaire d'accompagner les courbes d'étalonnage des renseignements suivants :

- Nature de la radiation employée.

- Epaisseur de la cuve utilisée.

### Les difficultés de la colorimétrie en lumière sélectionnée

Les difficultés à résoudre tiennent surtout à la présence possible, dans les solutions, d'impuretés colorées ou d'un trouble, cas rencontrés souvent en biologie. Ce trouble ou ces colorations parasites sont susceptibles d'entacher les dosages d'erreurs importantes, et, dans les cas défavorables, de leur ôter toute signification.

#### 1° Présence d'impuretés colorées; choix de la radiation convenable

Lorsque la solution à étudier ne contient pas d'impureté colorée, le choix de la radiation convenable est facile. On prendra une radiation ou une bande dans le spectre, correspondant à une forte absorption par la substance à doser; pour le rose bengale, absorbant fortement dans le vert, on choisira une radiation verte ou un écran possédant une bande de transmission dans le vert (écran vert). Dans ce cas, une faible variation de concentration entraînera une variation appréciable de la densité optique, d'où bonne sensibilité.

Au contraire, en présence d'une impureté colorée, un autre critère doit servir de guide. Il faut éviter d'attribuer à la substance à doser une absorption qui serait due à l'impureté, d'où nécessité de se placer dans une zone où la radiation sera absorbée uniquement par la substance à doser; si l'on ne peut réaliser cette solution parfaite, il faut utiliser la radiation pour laquelle l'absorption due à l'impureté est négligeable par rapport à celle due à la substance à doser. Pour faire ce choix, il est donc nécessaire, pour les cas délicats, d'examiner au spectroscope (un petit spectroscope à vision directe est généralement suffisant), le spectre de la solution pure et celui de l'impureté (ou du mélange : substance à doser et impureté). Evitant volontairement l'exemple du cholestérol sanguin, dont le dosage photométrique est loin d'être satisfaisant, considérons, par exemple, le cas du dosage de la phénol-sulfone-phthaléine dans une urine fortement colorée. Les spectres de la P.S.P. et de l'urine présentent l'aspect de la figure 2. On peut en conclure qu'un écran rouge, transmettant des radiations non absorbées par la P.S.P., sera inutilisable. Un écran bleu, transmettant des radiations absorbées à la fois par la P.S.P. et par l'urine, fournira une erreur par excès; en revanche un écran vert ou vert jaune permettra d'obtenir un dosage excellent.

#### 2° Présence d'un trouble

Cette seconde cause d'erreur n'est pas moins importante, et cependant, elle est souvent négligée. Le trouble provoque une perte de

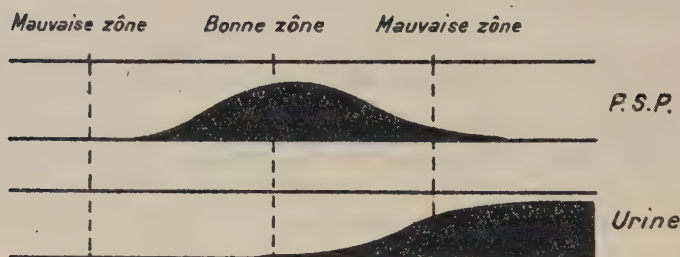


Fig.2

lumière par diffusion, et l'intensité perdue est comptée comme absorbée par la solution; il en résulte donc une erreur par excès qui n'est pas négligeable, même pour des solutions d'aspect presque limpide.

Le trouble peut être dû à la présence de particules en suspension : précipité colloïdal, comme celui qui se forme souvent lors du dosage de l'ammoniaque par la réaction de Nessler, de bulles gazeuses souvent difficiles à éliminer, en particulier dans le cas d'un liquide visqueux : c'est le cas du dosage photométrique des sels biliaires dans le sérum, comme le signale R. Charonnat.(18). La même erreur est causée par l'utilisation de cuves sales. A. Dognen a particulièrement souligné l'importance de ces erreurs, et indiqué des méthodes permettant de mettre un trouble en évidence, et également de s'en affranchir (26).

Il est à noter qu'en lumière blanche, par mesure visuelle, la présence d'un trouble bien que gênante, n'entraîne pas une erreur aussi importante qu'en lumière sélectionnée; en effet l'œil peut effectuer une comparaison de couleur sans s'attacher à l'intensité lumineuse, on peut alors réaliser une égalité de teinte alors que la luminosité des plages est différente.

### Conclusions

La colorimétrie en lumière sélectionnée a permis d'accroître considérablement la sensibilité et la précision des dosages biologiques, mais elle a fait naître une série de difficultés, dues aux impuretés colorées ou au trouble, dont il est nécessaire d'être averti pour éviter des erreurs parfois grossières.

## ETUDE DES MILIEUX TROUBLES

L'étude des propriétés optiques des milieux troubles soulève des problèmes du plus haut intérêt, à la fois pratiques et théoriques. Les innombrables travaux qu'elle a suscités envisagent : soit la réduction d'intensité que subit un faisceau de radiations lumineuses traversant un milieu trouble, soit sa diffusion, soit enfin sa polarisation; nous nous occuperons plus spécialement ici des deux premiers problèmes. Notre but est d'abord de préciser les différents facteurs qui interviennent pour modifier la densité optique d'un milieu trouble et la répartition de la lumière diffusée. Nous envisagerons ensuite ce que le biochimiste peut retirer d'une telle étude.

Il importe tout d'abord de préciser ce que l'on entend par milieu trouble. Comme le font remarquer Chéneveau et Audubert (19) une définition d'un milieu trouble n'est pas simple.

On considère en général qu'un milieu liquide est trouble lorsqu'il contient en suspension des particules; celles-ci peuvent être opaques, c'est le cas le plus général; elles peuvent également être transparentes; dans ce cas, la turbidité est due à une différence d'indices de réfraction entre les particules et le liquide; c'est ce qui se passe pour une émulsion d'huile dans l'eau par exemple.

Il est nécessaire en outre de distinguer : 1° les milieux purement diffusants c'est-à-dire, constitués par des particules non absorbantes, au sein d'un liquide non absorbant; toute la lumière arrêtée par un tel milieu est entièrement diffusée; de telles suspensions peuvent néanmoins paraître colorées, la diffusion s'accompagnant alors de phénomènes de dispersion, fonctions des indices de réfraction respectifs du liquide et des particules. - 2° Les milieux à la fois diffusants et absorbants par suite de l'absorption due au liquide ou aux particules ou aux deux à la fois (17).

Nous nous limiterons ici à l'étude des milieux purement diffusants et envisagerons :

1° L'étude de la densité optique des milieux troubles et sa mesure ou opacimétrie.

2° L'étude de la lumière diffusée et sa mesure ou néphélométrie.

### 1° Densité optique des milieux troubles - Opacimétrie

Les facteurs intervenant pour modifier la densité optique d'un milieu trouble sont multiples et leur étude assez complexe (102).

Il importe tout d'abord de rappeler avec Dognon (27) que l'on a l'habitude d'appliquer aux milieux troubles les lois classiques de Beer-

Lambert utilisées en colorimétrie

$$D = K. c. e.$$

La densité optique étant alors proportionnelle à l'épaisseur traversée et à la concentration c'est-à-dire à la quantité de substance en suspension; une telle conception acceptable dans certains cas n'est cependant pas générale; nous verrons ultérieurement les conditions dans lesquelles elle est valable.

#### Rôle de la distance cuve-récepteur

Dognon (28) attira l'attention sur un fait connu depuis longtemps mais encore souvent négligé : la densité optique d'un milieu trouble est fonction de la distance qui sépare la cuve contenant le liquide à examiner du dispositif récepteur des radiations, l'œil, la cellule photoélectrique.

Soit un faisceau incident  $I_0$  tombant sur une solution légèrement trouble placée en cuve mince : une partie de la lumière est transmise  $I_t$ , une partie est diffusée  $I_d$ . Si l'on considère un milieu purement diffusant,

$$I_0 = I_t + I_d$$

Lorsque le récepteur, une cellule photoélectrique par exemple, se trouve au contact de la cuve, il reçoit la totalité de la lumière transmise  $I_t$  et une partie de la diffusée qui est fonction de la fraction contenue dans l'angle solide  $\varepsilon$ .

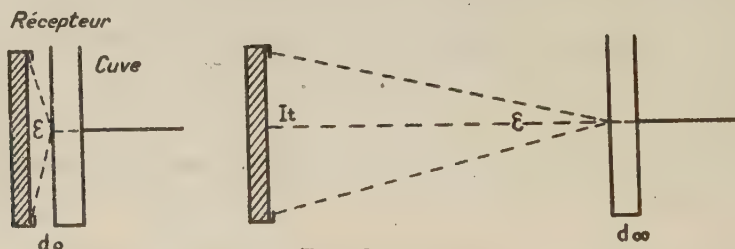


Fig. 3

Quand on éloigne la cuve du récepteur, l'angle solide diminue, la densité optique augmente, mais à partir d'une certaine distance, appelée  $d_\infty$  par A. Dognon, on peut considérer que la totalité du flux diffusé est perdue pour la cellule, et que la densité optique ne varie plus ; à ce moment, seul le flux transmis  $I_t$  parvient au récepteur.

Pour une même suspension la valeur de  $d_{\infty}$  est d'autant plus élevée que l'angle d'ouverture du récepteur et le diamètre du faisceau sont plus grands.

Ce fait montre tout d'abord qu'il est indispensable, quand on parle de la densité optique d'un milieu trouble, de bien préciser avant toutes choses les conditions géométriques de la détermination.

Les autres facteurs intervenant dans l'expression de la densité optique d'un milieu trouble sont essentiellement : la longueur d'onde de la radiation incidente - la taille des particules en suspension - leur nombre - les indices de réfraction respectifs du milieu et des particules.

#### Influence de la longueur d'onde

Lord Rayleigh fit remarquer le premier en 1871 le rôle joué par la longueur d'onde de la radiation incidente (96).

Son étude porte sur des particules dont les dimensions sont petites par rapport à la longueur d'onde, d'un diamètre inférieur à  $\frac{\lambda}{2}$ , soit pour les radiations visibles, inférieur à  $0,1 \mu$ . Dans ce cas la densité optique varie en raison inverse de la quatrième puissance de la longueur d'onde :

$$D = K \cdot \frac{1}{\lambda^4}$$

La densité optique pour un même milieu est d'autant plus grande que la longueur d'onde est plus petite, c'est-à-dire plus grande pour les radiations violettes. Cette étude fut reprise plus tard pour des particules plus grosses, par divers auteurs, en particulier par Boutaric en 1918 (12), par Chéneveau et Audubert (19), par Keen et Portner (58).

Après avoir confirmé les conclusions de Lord Rayleigh, Boutaric (12) montre que lorsque les particules grossissent, ce n'est plus la 4ème puissance de la longueur d'onde qui intervient dans l'expression de la densité optique; il donne une relation plus générale, s'appliquant à des particules de toutes tailles :

$$D = K \cdot \frac{1}{\lambda^n}$$

Boutaric, suivant l'évolution d'un précipité de chlorure d'argent, trouve que  $n$  varie depuis  $+4$  au moment de la précipitation à  $+2$  au bout d'une heure environ.

Keen et Portner (58) étudiant l'évolution d'un précipité de soufre colloïdal, qui s'effectue avec un grossissement beaucoup plus

considérable des grains, constatent que  $n$  peut même acquérir une valeur négative, c'est-à-dire qu'à ce moment la densité optique varie dans le même sens que la longueur d'onde de la radiation incidente. La densité optique est alors plus grande dans le rouge que dans le violet. Ces résultats expérimentaux, prévus par la théorie de Mie (78), ont été confirmés par Caspersson (15-16) puis ultérieurement par Chéneveau et Audubert (19); ces auteurs trouvent que  $n$  peut être compris entre  $+4$  et  $-1$ . Leurs déterminations portent sur des grains dont la taille varie dans de très larges limites, entre  $1$  et  $8\mu$ . Il apparaît en outre que la valeur de  $n$  passe par un minimum qui dépend à la fois de la taille des particules et de leur nombre. Si l'on représente graphiquement la variation de  $n$  en fonction de la taille des grains, on obtient pour différentes concentrations une série de courbes qui extrapolées vers les petits diamètres concourent vers la valeur  $+4$  prévue par la théorie de Lord Rayleigh.

Dans le domaine des grosses particules enfin, au-dessus de  $5\mu$  de diamètre il n'y a pratiquement plus d'effet chromatique, la densité optique est la même quelle que soit la longueur d'onde des radiations incidentes.

#### Influence de la taille des particules

Si l'on envisage la variation de la densité optique d'une suspension en fonction de la taille des particules, on constate là encore qu'il est nécessaire de distinguer trois domaines. (On considère une radiation incidente de longueur d'onde constante, et la cuve toujours dans les mêmes conditions géométriques loin du récepteur).

Lorsque les particules sont petites vis-à-vis de la longueur d'onde, la loi de Lord Rayleigh s'applique, la densité optique est proportionnelle au nombre de particules et au carré de leur volume

$$D = k. \frac{1}{\lambda^4} \cdot n \cdot v^2$$

Il en résulte, lorsque les grains d'une suspension grossissent sans varier de nombre, un accroissement rapide de la densité optique; puisque  $n$  reste constant,  $D$  croît comme  $v^2$  c'est-à-dire comme  $r^6$ , sixième puissance du rayon. Lorsque le grossissement s'effectue par accolement de plusieurs grains, leur nombre diminue comme  $\frac{1}{v}$ , la densité optique croît moins vite, proportionnellement à  $v$ , c'est-à-dire comme  $r^3$ . C'est ce qui se produit au cours d'une floculation.

Lorsque les particules sont sensiblement plus grosses, de diamètre supérieur à  $\frac{\lambda}{2}$ , l'accroissement de la densité optique en fonction du diamètre est beaucoup moins rapide; il atteint un maximum pour un diamètre voisin de  $0,5\mu$  environ dans la partie médiane du spectre;

puis il y a un palier ou même une légère décroissance de la densité optique. Dans ce domaine, lorsque l'accroissement de la taille est dû à une coalescence, la densité optique croît plus lentement, atteint un maximum puis décroît un peu plus vite.

Quand la taille des particules est encore plus grande, vers  $0,6 \mu$  environ, des considérations géométriques sont applicables; la densité optique varie comme l'aire projective des grains, c'est-à-dire augmente comme  $r^2$  quand la variation de taille s'effectue à nombre constant, et diminue comme  $\frac{1}{r}$  quand il y a une coalescence de plusieurs grains.

Le tableau ci-dessous (fig.4), emprunté à Dognon(29) schématise cette variation de la densité optique en fonction de la taille, soit que l'accroissement s'effectue à nombre constant, soit qu'il ait son origine dans une coalescence.

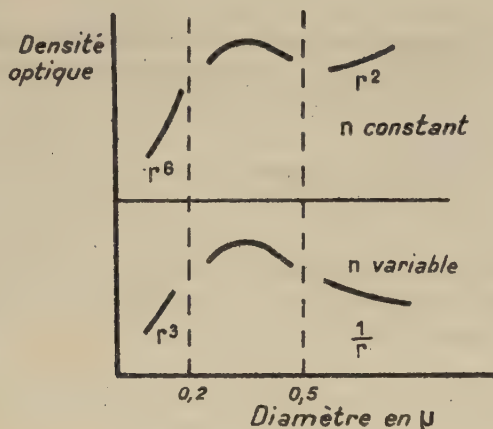


Fig.4

La courbe de variation de la densité optique en fonction de leur taille, à nombre de particules constant, peut sembler surprenante en ce qui concerne le domaine qui s'étend de  $0,2 \mu$  à  $0,5 \mu$ , à priori, une diminution de la densité optique lorsque la taille augmente, ne paraît pas possible. La vérification expérimentale serait utile mais extrêmement difficile à réaliser; il faudrait pour cela préparer une série de suspensions de particules de taille homogène, de forme parfaitement régulière.

En outre, il importe de rappeler la façon dont se répartit la lumière diffusée autour de la cuve lorsque la taille des particules varie. Quand on se trouve dans les limites de validité de la loi de Lord Rayleigh, la lumière se répartit symétriquement autour de la cuve; quand les grains sont plus gros, dès un diamètre  $\frac{\lambda}{2}$ , le flux diffusé se concentre vers l'avant; quand les particules sont grosses, la rétrodiffusion

est pratiquement nulle, toute la lumière diffusée se retrouvant dans l'hémisphère antérieure. Le Schéma suivant rend compte de cette répartition de la lumière diffusée en fonction de la taille des particules.

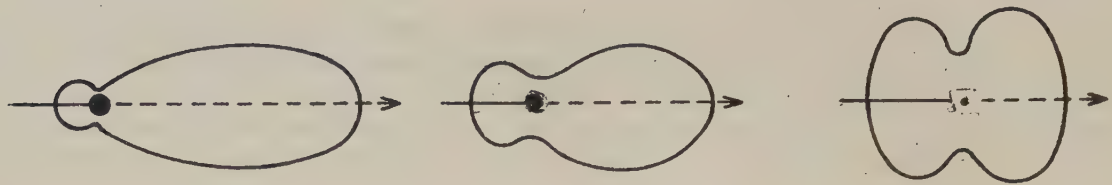


Fig.5

Ceci n'est d'ailleurs vrai que si l'on considère une suspension peu concentrée examinée sous forte épaisseur, c'est-à-dire pour laquelle la diffusion secondaire, due à l'éclairement des grains par des rayons diffusés par d'autres grains, est faible; en effet cette diffusion secondaire tend à faire disparaître cette dissymétrie. Dans un milieu très trouble en effet, la rétrodiffusion peut même devenir prépondérante.

A. Dognon a eu recours à cette différence de répartition de la lumière diffusée pour proposer une méthode simple permettant de suivre le grossissement des grains d'une suspension.

Il suffit de considérer le rapport des absorptions pour deux positions de la cuve, position éloignée et position au contact du récepteur.

En position éloignée  $d_{\infty}$ , toute la lumière diffusée est pratiquement perdue, au contraire, en position de contact  $d_0$ , l'absorption est plus faible, le récepteur recevant en plus du flux transmis, une partie de la lumière diffusée, d'autant plus grande que le flux diffusé est davantage réparti vers l'avant.

Si l'on suppose l'indice des grains constant, le rapport  $R$  des absorptions pour les positions  $d_{\infty}$  et de  $d_0$  augmentera avec la taille des particules.

Il faut toutefois opérer avec des milieux dilués afin de réduire la diffusion secondaire.

Il faut noter toutefois, que la position de contact  $d_0$  est toujours mal définie, car il n'est pas possible de placer le récepteur exactement au contact de la cuve; aussi, dans le domaine de taille de particules où la loi de Lord Rayleigh est valable, alors que le rapport  $R$  devrait être égal à 2 on trouve toujours une valeur inférieure à celle-

ci; les valeurs numériques de ces rapports dépendent donc des conditions expérimentales.

Un autre procédé peut également être utilisé pour évaluer grossièrement la taille des particules en suspension; on détermine le degré de polarisation de la lumière diffusée; celle-ci est d'autant plus polarisée que les particules sont plus petites.

#### Influence de l'indice de réfraction

Lorsque les particules sont petites et d'indice  $m$ , pas trop différent de celui du milieu  $m_0$ , la loi de Rayleigh s'applique; dans son ensemble elle prend alors la forme :

$$D = K \cdot \frac{1}{\lambda^4} \cdot n \cdot v^2 \left( \frac{m - m_0}{m + m_0} \right)^2$$

La densité optique croît quand la différence des indices augmente. Pour les particules plus grosses, l'influence de l'indice de réfraction est mal précisée.

En conclusion à l'étude théorique de la densité optique des milieux troubles, on peut faire quelques remarques d'intérêt pratique.

1° L'application aux milieux troubles d'une loi type Beer-Lambert n'est valable que si l'on a soin de placer la cuve dans des conditions géométriques toujours identiques; elle pourra même être exacte en lumière blanche si les particules ne présentent pas le phénomène de Lord Rayleigh. En effet, la loi de Beer-Lambert valable pour le flux transmis, l'est aussi pour le flux diffusé.

2° L'importance de la taille des grains est considérable surtout dans le domaine des petites particules; elle l'est beaucoup moins lorsque le diamètre est voisin de  $\lambda$ .

#### 2° Diffusion de la lumière par les milieux troubles : Néphélémétrie

La mesure de la lumière diffusée par les milieux troubles constitue la méthode néphélémétrique. Le flux peut être mesuré sous des angles divers; il est d'autant plus grand que l'angle est plus petit, quand la diffusion antérieure est importante; l'angle est mesuré en prenant pour origine la direction du faisceau émergent. Pratiquement on opère sous des angles de  $45^\circ$  ou de  $90^\circ$ .

La diffusion antérieure étant beaucoup plus grande pour les suspensions à gros grains que pour celles à grains fins, il sera toujours indispensable de préciser exactement les conditions expérimentales.

Lorsque la diffusion secondaire est négligeable, l'intensité du flux diffusé est liée à la concentration en particules diffusantes; aux fortes concentrations au contraire, le flux diffusé latéralement peut être faible et la rétrodiffusion importante; la suspension se comporte alors comme un mur blanc.

Dognon (30) effectuant la mesure de la diffusion latérale sous  $90^\circ$  avec plusieurs longueurs d'onde pour des suspensions en cours de floculation constata expérimentalement qu'en lumière rouge, la diffusion n'était pas influencée sensiblement par la taille des particules, l'intensité du flux diffusé dépendant uniquement de la quantité de matière en suspension. Cette remarque importante a été vérifiée dès que l'angle d'observation est supérieur à  $20^\circ$ .

La figure ci-dessous empruntée à Dognon et Dumontet rend compte de ce phénomène (30).

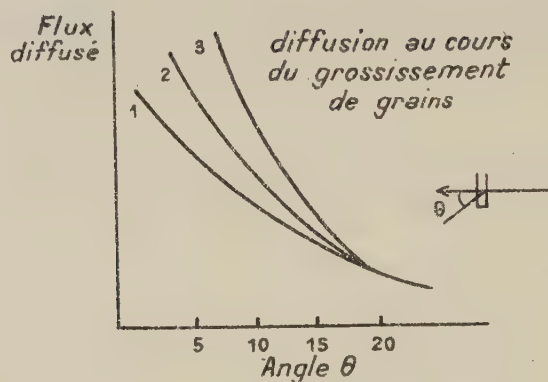


Fig. 6

Ceci plaide en faveur de l'emploi de la néphélométrie en lumière rouge chaque fois que l'on désire évaluer une quantité de matière en suspension en s'affranchissant des erreurs que peut causer l'inégalité de la taille des particules.

### Conclusions

En résumé il semble préférable avec A. Dognon de recourir à la mesure du flux diffusé sous  $90^\circ$  pour la détermination de la masse d'une substance en suspension quand la taille des particules est susceptible de varier, et de réserver les mesures d'absorption suivant l'axe du faisceau, particulièrement dans les positions  $d_0$  et  $d_\infty$  pour l'étude de la grosseur des grains et de la variation de celle-ci; on opérera de préférence en lumière monochromatique et sur des suspensions diluées pour réduire la diffusion secondaire.

Le tableau ci-dessous emprunté à A. Dognon fait bien ressortir les intérêts respectifs des deux méthodes (31). Les mesures sont effectuées pour des suspensions à gros grains :  $3\mu$  et à grains fins  $0,1\mu$  contenant la même quantité de matière.

OPACIBLE TRIT

|                 | <u>OPACIMÉTRIE</u> |                  | <u>Lumière Rouge</u> |         | <u>Lumière Bleue</u> |     |
|-----------------|--------------------|------------------|----------------------|---------|----------------------|-----|
| absorption en % | pour $d = 0$       | pour $d = 6$ cm. | R                    | $d = 0$ | $d = 6$ cm.          | R   |
| gros grains     | 23                 | 57               | 2,4                  | 27      | 59                   | 2,2 |
| petits grains   | 11                 | 13               | 1,2                  | 26      | 31                   | 1,2 |

On remarquera :

- 1° - que l'absorption, qui est 2 fois plus grande pour  $d = 0$  avec les gros grains, est 4 fois plus élevée pour la position éloignée.
- 2° - qu'il n'y a pas d'effet chromatique sensible pour les gros grains.
- 3° - que l'accroissement du rapport R en fonction du diamètre.

- 17

NEPHILIM IN THE

# Valours arbitraires

Flux diffusé vers  $90^\circ$ 

|                       | <u>Lumière Rouge</u> | <u>Lumière Blanche</u>              |
|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Flux diffusé vers 90° |                      |                                     |
| gros grains           | 65                   | avec écran polarisant<br>axe normal |
| petits grains         | 60                   | 11<br>axe parallèle                 |
|                       |                      | 25<br>10                            |

On remarquera :

- 1° - la faible différence de diffusion pour les 2 tailles de grains en lumière rouge, son importance en lumière blanche.
- 2° - l'absence de polarisation par les grosses particules, une polarisation nette pour les petites.

## 2<sup>ème</sup> PARTIE : ETUDE CRITIQUE DES TECHNIQUES DE MESURE

Nous examinerons d'abord, en soulignant leurs avantages respectifs, les dispositifs qui entrent dans la construction des appareils les plus couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse médicale, photomètres et électrophotomètres.

Nous décrirons ensuite les appareils que nous avons employés au cours de nos recherches, en indiquant les raisons de notre choix. Dans une publication précédente (98) nous avons fait une étude plus complète des différents dispositifs.

### A - PRINCIPES GENERAUX DES APPAREILS DE MESURE

On peut considérer la plupart des appareils comme constitués essentiellement de trois parties :

- 1° - Un dispositif produisant des radiations sélectionnées.
- 2° - Un dispositif réducteur d'intensité lumineuse permettant de faire subir au faisceau une diminution d'intensité égale à celle produite par absorption dans la solution.
- 3° - Un dispositif permettant d'effectuer la comparaison entre ces deux réductions d'intensité.

#### 1° - Production de radiations sélectionnées

Le meilleur dispositif sera celui qui permettra d'obtenir des radiations monochromatiques. Dans la pratique courante, seules sont utilisables les lampes à vapeur de sodium et à vapeur de mercure.

Les lampes à vapeur de sodium commerciales fournissent pratiquement les radiations monochromatiques de longueurs d'onde  $\lambda = 5.890$  Å et  $5.896$  Å (doublet de radiations jaunes) accompagnées des raies du gaz rare assurant l'amorçage de la lampe, dont l'intensité, en régime normal, est négligeable.

Les lampes à vapeur de mercure que l'on peut employer sont de deux types : type classique de Hewit à arc dans le vide, fournissant strictement le spectre de raies du mercure, mais volumineuses, peu maniables; lampes à vapeur de mercure sous pression, contenant dans une petite ampoule de quartz une gouttelette de mercure et un gaz rare permettant l'amorçage; ces lampes sont très pratiques, mais possèdent l'inconvénient suivant : au spectre du mercure se surajoute celui du gaz

rare que l'on peut négliger et aussi un fond continu de lumière blanche dû à l'ampoule de quartz portée du fait de l'arc à très haute température. L'arc au mercure fournissant essentiellement :

Un doublet de raies jaunes :  $\lambda = 5.769$  et  $5.790 \text{ \AA}$ .

Une raie verte :  $\lambda = 5.461 \text{ \AA}$ .

Une raie violette :  $\lambda = 4.539 \text{ \AA}$ .

il est nécessaire de disposer sur le trajet du faisceau un écran sélectif permettant de séparer l'une ou l'autre de ces radiations. Les écrans Wratten suivants répondent à ces conditions : n° 22 pour les raies jaunes, n° 62 ou 77 A pour la raie verte, n° 50 pour la raie violette.

Par suite du champ d'action assez restreint que peuvent offrir ces lampes, il est nécessaire d'envisager d'autres modes de production de radiations sélectionnées, qui fourniront des bandes plus ou moins étroites. On aura recours soit à des écrans colorés placés sur le trajet d'un faisceau de lumière blanche, soit à l'emploi de réseaux. La qualité des dispositifs à écrans colorés est fonction de la sélectivité de ceux-ci. Les plus sélectifs, généralement en acétate de cellulose (Pülfrieh), fournissent des bandes d'environ  $500 \text{ \AA}$  de largeur, d'autres, en même

matière, des bandes plus larges de  $1.000 \text{ \AA}$  environ (série "Monochromatic" de Wratten). Ces écrans seront évidemment d'autant moins lumineux qu'ils seront plus sélectifs. Les écrans de verre sont souvent de qualité médiocre, surtout en ce qui concerne les écrans jaunes (très peu sélectifs) et les écrans bleus (verres au cobalt présentant de nombreuses bandes éparses dans spectre). Les écrans en acétate de cellulose, très sensibles à l'action de la chaleur, doivent être protégés par des filtres anticaloriques arrêtant l'infra-rouge, ou placés loin de la source.

L'emploi de réseaux comme systèmes dispersifs est encore assez peu fréquent; ces dispositifs ne permettent pas d'utiliser des bandes très étroites.

## 2° - Dispositifs réducteurs d'intensité

La plupart des appareils comportent des systèmes permettant de réduire l'intensité du faisceau incident dans des proportions connues et variables graduellement. On produira grâce à eux, une réduction d'intensité égale à celle produite par la solution examinée sous épaisseur constante. Les dispositifs les plus courants sont les suivants :

Diaphragme-chat (Pülfrieh) mû par un tambour gradué permettant d'évaluer la surface de l'orifice; ce système est excellent, sauf pour les très faibles ouvertures.

Coin en verre de teinte neutre (Vernes, Meunier) constitué par un prisme en verre gris dont l'absorption variera suivant l'épaisseur du coin devant le faisceau, sur le trajet duquel il pourra être déplacé. Il possède souvent l'inconvénient de ne pas présenter une densité optique uniforme dans toute l'étendue du spectre (généralement ils sont plus transparents dans le rouge que dans le bleu) d'où difficulté pour effectuer des mesures en densité optique (un même point du coin ayant des densités optiques différentes suivant l'écran utilisé). Il faut alors se contenter de graduations arbitraires ou utiliser un coefficient de transformation.

Roue de Talbot (Bonet-Maury), constituée par une pale pouvant tourner rapidement devant le faisceau et intercepter ainsi une partie de la lumière. La forme de la pale est calculée de telle façon qu'un déplacement linéaire de celle-ci devant le faisceau produise une réduction logarithmique de son intensité. On peut ainsi déduire de la position de la pale la densité optique qui lui correspond. Elle dépend uniquement de la position de la pale; elle est indépendante de la vitesse de rotation de celle-ci. La valeur d'un tel dispositif est évidemment fonction de la qualité de sa construction.

Dans le cas où l'on utilisera une cuve permettant de faire varier l'épaisseur de la solution, on pourra se contenter d'un réducteur d'intensité fixe, un écran en verre de teinte neutre qui présentera les mêmes inconvénients qu'un coin.

C'est également un dispositif donnant une réduction constante du faisceau qui équipe le photomètre de Dognon; il est constitué par une gamme de grilles qui sont faites de petites barres parallèles solidement fixées sur une monture rigide et interceptant une quantité de lumière correspondant au rapport de la surface des barreaux à la surface totale.

### 3° - Dispositif de comparaison

L'appréciation des réductions d'intensité s'effectue soit à l'œil (Pülfrich, Vernes), soit à l'aide de cellules photoélectriques (Meunier, Dognon, Bonet-Maury, etc...). Les mesures visuelles ne sont possibles que si l'on utilise des radiations monochromatiques ou des bandes très étroites. Elles sont alors faciles mais, toutefois, un peu fatigantes pour un œil peu exercé, lors de mesures en grandes séries. Les cellules photoélectriques apportent une sensibilité beaucoup plus grande, une simplicité extrême dans les mesures, mais aussi beaucoup de petits ennuis dus au manque de stabilité, à la fatigue de ces appareils. Pour réduire ces inconvénients, il est indispensable de limiter le temps de fermeture du circuit, d'éclairer le moins possible les cellules, et d'étaler les faisceaux sur la totalité de celles-ci.

On utilise, de préférence, les cellules à couche d'arrêt ou

les cellules photovoltaïques, toutefois, un récent modèle de photomètre (Vernes-Bricq-Constans) est équipé de cellules photoémissives au césium, nécessitant un système amplificateur.

L'emploi de cellules photoélectriques rend indispensable l'utilisation d'une alimentation très stable qui ne peut être fournie que par des stabilisateurs spéciaux mettant à l'abri des variations fréquentes de voltage (dues aux ascenseurs, appareils de radio. etc...) ou par des accumulateurs de grande capacité constamment maintenus en charge.

## B - APPAREILS UTILISES

### Diffuso-absorptiomètre de Dognon

#### Description

Nous avons adopté cet appareil, car il présente à nos yeux un certain nombre d'avantages, surtout en ce qui concerne l'étude des milieux troubles. Seul en effet il permet à la fois d'effectuer des mesures d'absorption sur des solutions colorées ou troubles, et des mesures de diffusion latérale (32). Il est possible en outre d'évaluer approximativement la taille des particules en suspension, par mesure de l'absorption du milieu trouble à différentes distances de la cellule photoélectrique, et en évaluant le degré de polarisation de la lumière diffusée.

Une lampe S, de 6 volts 6 ampères, constitue la source; on utilise deux faisceaux opposés tombant respectivement sur deux cellules photoélectriques à couche d'arrêt  $P_1$  et  $P_2$ , montées en opposition dans un circuit comprenant un microampèremètre M dont la résistance intérieure est d'environ 800 ohms.

(Voir figure p. 22).

Les 150 divisions de l'échelle correspondent à 15 microampères. Le faisceau de gauche est le faisceau de mesure, celui de droite, le faisceau de compensation.

Entre la lampe et la cellule de mesure  $P_1$  sont interposés successivement : une lentille L fournissant un faisceau de lumière parallèle, un écran anticalorique Ac destiné à absorber les radiations infrarouges et à protéger ainsi la cellule, un écran Wratten W de couleur convenable, un diaphragme fixe D limitant le diamètre du faisceau à 7 mm. Un revolver permet d'interposer sur le trajet des rayons des grilles amovibles G, dont les absorptions sont connues. Le faisceau traverse ensuite la cuve C et vient frapper un écran opale placé devant la cellule; le rôle de cet écran est de répartir le flux lumineux sur la tota-

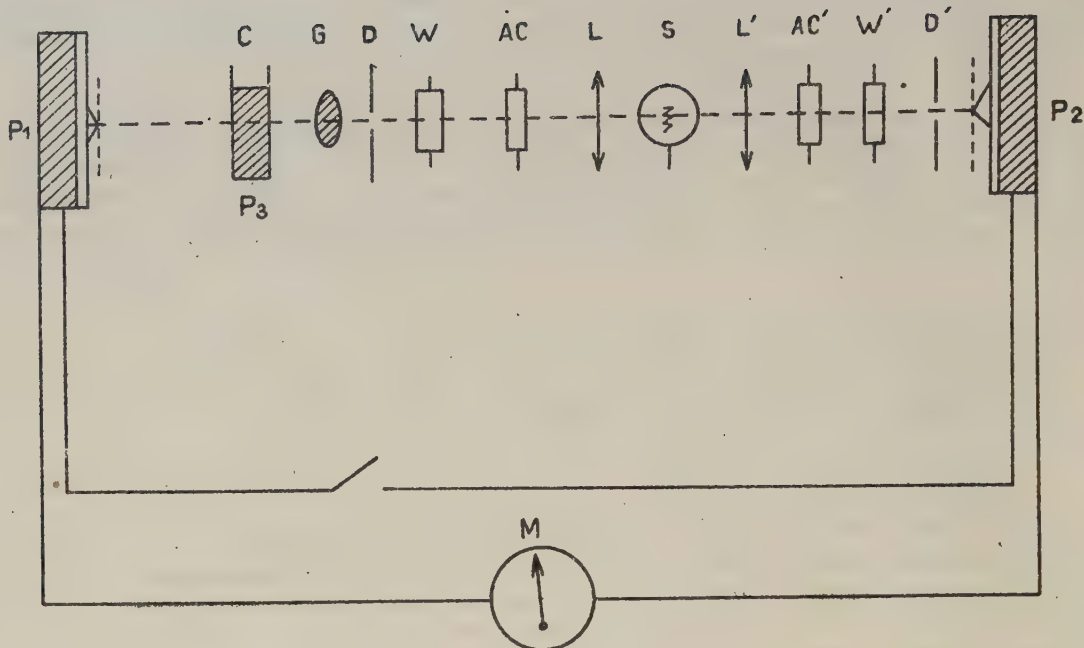


Fig. 7

lité de la surface de la cellule; on évite ainsi les inégalités de sensibilité qui peuvent exister en certains points de la couche sensible, et la fatigue de celle-ci au point d'impact. Le faisceau compensateur traverse également une lentille  $L'$ , un écran anticalorique  $AC'$ , un écran coloré Wratten  $W'$ , un diaphragme iris réglable  $D'$  et un écran diffusant avant de tomber sur la cellule  $P_2$ ; une deuxième position en  $P_3$  est prévue pour la cellule de mesure, à 90 degrés du faisceau incident pour les études de diffusion. L'alimentation de la source est assurée par l'intermédiaire d'un transformateur-stabilisateur, mettant à l'abri des variations de voltage (90 à 120 volts environ). Deux rhéostats  $R$  et  $R'$  permettent de faire varier l'éclat de la lampe.

Il existe une différence essentielle entre ce photomètre et les précédents. La mesure de l'absorption ne s'effectue pas ici par compensation mais par mesure directe de l'intensité du courant produit, la résistance du circuit électrique (cellules, microampéremètre) étant calculée pour qu'il y ait proportionnalité rigoureuse entre l'absorption et l'intensité du courant produit. Un tel dispositif est particulièrement utile pour l'étude cinétique des réactions évoluant rapidement. Une autre caractéristique de cet appareil est à signaler : il est possible de déplacer la cuve dans son logement et de la disposer ainsi, soit au contact immédiat de l'écran diffusant, soit de la reculer jusqu'à 6 cm. de celui-ci.

## Utilisation

### Mesure en transmission

Elles s'effectuent en trois temps :

1° Réglage de l'appareil au zéro, en compensant à l'aide du diaphragme iris, l'absorption due au solvant pur.

2° Réglage de l'intensité de la lampe permettant, par l'interposition d'une grille d'absorption connue, d'établir une correspondance entre l'absorption et la déviation du microampèremètre. On fera par exemple suivant la sensibilité désirée, correspondre 1 pour 100 d'absorption à 1,2 ou 3 divisions.

3° La grille étant retirée du trajet du faisceau, remplacer le solvant par la solution à étudier et lire la déviation obtenue.

On se rapporte toujours à une courbe d'étalonnage qui ne sera valable que dans des conditions précises : écran coloré, épaisseur et position de cuve, sensibilité par rapport à l'une des grilles. Une telle courbe est valable pour tous les appareils si l'on se place dans les mêmes conditions expérimentales, car l'absorption est exprimée en absorption et non en degrés arbitraires.

### Mesures en diffusion

Elles n'utilisent qu'une seule cellule montée dans le circuit du microampèremètre.

On emploie une cuve de 20mm. placée dans l'axe de la cellule montée en  $P_2$ . Pour augmenter l'intensité de la lumière diffusée latéralement, un premier miroir placé immédiatement après la cuve, et un second sur la face de la cuve opposée à la cellule renvoient la lumière diffusée antérieurement et latéralement. (voir fig. 8)

Le réglage est simple; il suffit, pour établir la correspondance entre l'intensité de la lumière diffusée et l'intensité du courant, de remplacer la cuve par une grille très absorbante, (95 p. 100 par exemple) placée devant un petit miroir orienté à  $45^\circ$ , qui réfléchit sur la cellule la totalité du rayonnement transmis.

Signalons enfin l'existence de deux écrans polarisants permettant de déterminer l'importance de la polarisation produite par un milieu trouble; le premier écran peut se placer sur le trajet du faisceau incident, le second sur le trajet du faisceau diffusé; ces mesures fournissent des renseignements utiles sur la taille des particules. (voir tableau p. 17)

Si nous marquons notre préférence pour un électrophotomètre, en

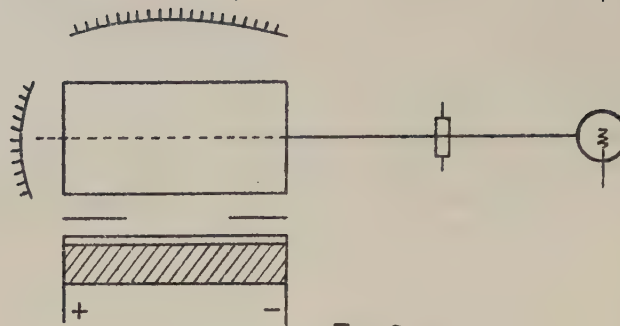


Fig. 8

raison des bons résultats que nous avons obtenus, il nous paraît utile de rappeler que la photométrie visuelle permet d'obtenir une grande précision, si l'on se place dans des conditions particulières, établies par des recherches optiques approfondies.

Le service photométrique de l'Institut d'Optique (J. TERRIEN et DESVIGNES) a indiqué ces conditions au cours de la mise au point d'un appareil de recherches très précis, qui présente les caractéristiques suivantes :

1° Utilisation d'une source de grande brillance, permettant des mesures dans les parties extrêmes du spectre visible.

2° Séparation des deux faisceaux à partir d'un faisceau unique à l'aide d'une lame semi-transparente inclinée (Pr. FLEURY). On évite ainsi les variations de brillance des plages, dues au déplacement de l'oeil devant le faisceau ou à des variations d'intensité de l'alimentation de la source.

3° Utilisation de faisceaux courts.

4° Système de gradation de la lumière comprenant un disque de Talbot permettant des réductions d'intensité rigoureuses mais discontinues, et d'un écran en verre tout à fait neutre servant à interpoler entre deux densités optiques du disque tournant.

5° Le système de gradation et la cuve sont placés sur le même faisceau, le deuxième, réduit toujours d'une façon constante, servant uniquement de tare.

Il nous a semblé intéressant de signaler ces quelques points, sans aller plus avant dans la description du montage, qui paraît résumer ce que nous pouvons atteindre actuellement dans le domaine de la photométrie visible.

Nous n'avons pas pu nous servir, pour nos mesures, de cet appareil dont l'emploi est seulement du domaine d'un laboratoire spécialisé en optique.

En revanche, il nous a été possible d'utiliser le prototype d'un très petit photomètre visuel portatif, dérivé du montage précédent, construit par le Docteur Lagailarde, qui permet d'effectuer des mesures photométriques en transmission, dans des cuves de quelques  $\text{mm}^2$ , sous des épaisseurs de 2 à 10 mm.

Nous le remercions bien vivement de l'amabilité avec laquelle il a accepté de nous confier son appareil, dont nous avons pu apprécier la sensibilité et la grande facilité d'utilisation.

\*\*\*\*\*

### 3ème PARTIE : EXPOSE DE QUELQUES TECHNIQUES

Nous exposerons maintenant des applications pratiques de la colorimétrie et de l'étude des milieux troubles, à quelques méthodes de mesure et à quelques micro-dosages en biologie.

Elles se rapporteront à l'hématologie et à l'analyse biochimique.

#### A. - APPLICATION A L'HEMATOLOGIE

Dans ce domaine, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude de trois problèmes :

- Numération des hématies
- Mesure du diamètre moyen des hématies
- Dosage de l'hémoglobine

#### I° NUMERATION DES HEMATIES

La numération des hématies est effectuée classiquement à l'aide de cellules hématimétriques de différents types, permettant de compter, sur une dilution de sang convenable, le nombre de globules rouges contenu dans un volume connu; ce volume est délimité par une lame gravée portant un quadrillage de surface connue, et par une lamelle reposant sur des pivots à une distance constante de la lame. Les cellules les plus habituelles sont, la cellule de Malassez, la cellule de Thoma-Bürker. Celle-ci possède sur la précédente l'avantage d'être taillée dans la masse du verre si bien que la lamelle repose directement sur la lame délimitant un volume rigoureusement constant. Les dilutions utilisées varient suivant les opérateurs entre  $1/200$  et  $1/400$ .

De nombreux auteurs ont insisté sur les précautions à prendre pour obtenir de bons résultats : emploi de pipettes de dilution soigneusement vérifiées, de cellules contrôlées, de lamelles rodées. Néanmoins la précision n'est pas très grande à cause de l'inégalité dans la répartition sur la cellule, et de la grande dilution utilisée. Elle dépend du

nombre d'hématies comptées effectivement dans l'élément de volume considéré. Si ce nombre n'est que de 100, la limite de l'erreur est de 10 p.100 soit 500.000 sur 5 millions; si le nombre est de mille l'erreur est de 3,3 p. 100 soit environ 150.000 pour 5 millions d'hématies. Une telle précision n'est d'ailleurs pas nécessaire en clinique. Une telle détermination reste toutefois assez longue et fatigante lorsque l'on doit pratiquer des examens en série, au cours du dépistage des anémies en médecine du travail par exemple.

Divers auteurs, Lavergne en particulier, ont rendu cette mesure plus facile en simplifiant le comptage; l'image du champ de la cellule est projetée sur un écran recouvert d'un papier. Les hématies sont repérées à l'aide de croix, puis celles-ci dénombrées très facilement. On évite ainsi les erreurs fortuites dues à l'expérimentateur, une même hématie ne risque pas d'être oubliée ou comptée deux fois.

Pour rendre la numération plus pratique et plus rapide, quelques auteurs ont eu recours à la méthode photométrique; Marcandier, Bideau et Dubreuil (76) ont présenté en 1921 une technique qui fut adoptée en 1934 par A. Vernes, R. Bricq, Fr. Bazouche (106); elle consiste en une photométrie en transmission, (dans le sens du faisceau) en lumière rouge; la courbe d'étalonnage qu'ils fournissent est une droite.

Cependant, a priori, le problème de la numération des hématies par photométrie n'est pas simple. En effet, on est en présence d'éléments dont la forme est très particulière, la taille non rigoureusement constante, la structure hétérogène; l'hématie est constituée par une enveloppe plus ou moins épaisse, diffusante, bien mise en évidence par photographie au microscope électronique par Wolpers(107), contenant une substance colorée, l'hémoglobine, dissoute à côté de diverses molécules et ions. En outre, le sang contient des éléments fortement diffusants, en nombre beaucoup plus faible mais très variable, les leucocytes.

Il nous a semblé utile de préciser le rôle de ces différents facteurs en vue de choisir une méthode plus simple que les techniques hématimétriques, fournissant une précision au moins aussi bonne que celles-ci.

Nous avons comparé les méthodes diaphanométriques (mesures en transmission) et les méthodes néphélométriques (mesures en diffusion) et envisagé le rôle :

- de la forme et de la taille des hématies,
- de la longueur d'onde de la lumière incidente,
- des leucocytes,
- du liquide de dilution.

Les mesures en transmission ont été effectuées à l'aide du photomètre visuel du Docteur Lagaillarde et du diffusio-absorptiomètre de Dognon, les mesures en diffusion uniquement avec ce dernier appareil.

a - Conditions expérimentales initiales

Avec le photomètre du Docteur Lagaillarde nous avons employé comme celui-ci le fait depuis plusieurs années une dilution à  $1/300$  à l'aide du liquide de Marcano; la dilution est examinée sous 2 millimètres d'épaisseur en lumière verte. (écran Wratten 74).

Avec le photomètre de Dognon, en transmission, nous avons fixé la dilution à  $1/2.000$ , l'épaisseur de la cuve à 5 mm., la sensibilité à 2 divisions de l'échelle pour 1 p.100 d'absorption; la lecture est faite en lumière verte, la cuve étant placée en position éloignée, par rapport à la cellule. Pour la diffusion il est nécessaire d'opérer avec une dilution moins grande  $1/500$ , en cuve de 20 mm., et une sensibilité correspondant à 130 divisions pour 5 p.100 de diffusion; nous avons opéré initialement en lumière blanche.

Nous avons alors procédé à des déterminations en série, tant en diffusion qu'en transmission; pour chaque sang on a effectué à l'aide d'une cellule de Malassez contrôlée par rapport à une cellule de Thomas-Bürker de précision, et de pipettes étalonnées, la numération des hématies et des leucocytes.

Il est tout de suite apparu que les mesures par diffusion donnaient lieu à des courbes beaucoup moins précises que celles qui correspondaient à la transmission. Pour la diffusion, les courbes étaient faites en déterminant six points avec une dilution mère à  $1/250$ . Voici quelques résultats ayant permis de tracer la courbe IX :

Sang I

| <u>nombre d'hématies (par</u><br><u>millimètre cube pour une dilution à <math>1/500</math>)</u> | <u>Divisions (dont on a</u><br><u>retranché la diffusion</u><br><u>d'un témoin)</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 10.160.000                                                                                      | 70                                                                                  |
| 8.467.000                                                                                       | 62                                                                                  |
| 7.255.000                                                                                       | 58                                                                                  |
| 6.285.000                                                                                       | 51                                                                                  |
| 4.240.000                                                                                       | 36                                                                                  |
| 3.140.000                                                                                       | 29                                                                                  |

Sang V

nombre d'hématies (par  
millimètre cube pour une dilution à 1/500

Divisions (dont on a  
retranché la diffusion  
d'un témoin)

|            |    |
|------------|----|
| 10.400.000 | 73 |
| 8.667.000  | 66 |
| 7.425.000  | 61 |
| 6.500.000  | 55 |
| 4.335.000  | 40 |
| 3.250.000  | 32 |

Sang VII

|            |    |
|------------|----|
| 10.460.000 | 70 |
| 8.700.000  | 61 |
| 7.470.000  | 57 |
| 6.500.000  | 51 |
| 4.350.000  | 52 |
| 3.250.000  | 25 |

On constate sur la courbe que la sensibilité reste faible dans la zone voisine de 5 millions.

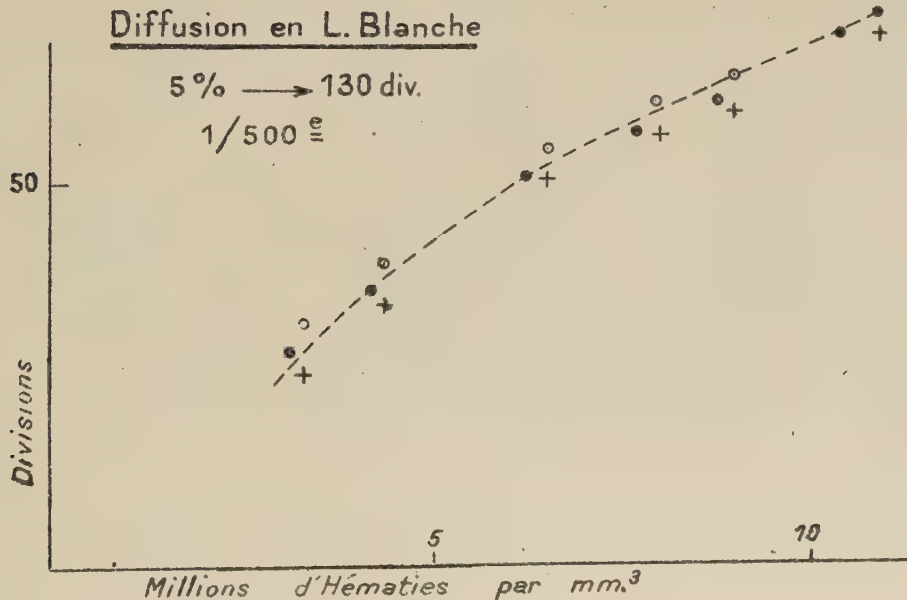


Fig. 9

Au contraire en transmission les résultats furent beaucoup plus favorables, et nos essais ont été poursuivis surtout dans cette voie.

b - Obtention de la courbe d'étalonnage en transmission

On prélève une goutte de sang au doigt par piqûre à l'aide d'un vaccinostyle stérile, dans une pipette de 20 mm<sup>3</sup> jaugée à sec à 5, 10, 15 et 20 mm<sup>3</sup> (des pipettes ont été vérifiées préalablement par pesée de mercure). On mesure 10 mm<sup>3</sup> de sang que l'on dilue dans 10 cm<sup>3</sup> de liquide de Marciano en rinçant la pipette avec soin; on a ainsi une dilution à 1 p. 1.000.

La formule du liquide de dilution est la suivante :

|                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| Sulfate de sodium cristallisé | 5 grs               |
| Solution de formol à 40 p.100 | 1 cm <sup>3</sup>   |
| Eau distillée Q.S.P.          | 100 cm <sup>3</sup> |

On prépare sur la même goutte une dilution à 1/200 à l'aide d'un mélangeur de Potain pour faire la numération à la cellule. On compte au moins 500 hématies.

La dilution à 1 p.1.000 sert ensuite à préparer une gamme de neuf tubes.

| Tube | cm <sup>3</sup> de dilution | cm <sup>3</sup> de Marciano |
|------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1    | 2                           | 0                           |
| 2    | 1,75                        | 0,25                        |
| 3    | 1,50                        | 0,50                        |
| 4    | 1,25                        | 0,75                        |
| 5    | 1                           | 1                           |
| 6    | 0,75                        | 1,25                        |
| 7    | 0,50                        | 1,50                        |
| 8    | 0,25                        | 1,75                        |
| 9    | 0                           | 2                           |

Si l'on opère dans les conditions indiquées précédemment, c'est-à-dire en diluant le sang à 1/2.000, c'est le tube 5 qui correspond à la dilution convenable; dans ce cas le tube 1 équivaut à un sang deux fois plus riche en hématies. Pour dix sangs différents, nous avons obtenu des droites très superposables qui permettent de tracer une courbe d'étalonnage. Voici quelques-uns de ces résultats. (fig.10)

SANG XI

| nombre d'hématies par mm <sup>3</sup> | Divisions | Absorption p.100 |
|---------------------------------------|-----------|------------------|
| 9.340.000                             | 94        | 47               |
| 8.170.000                             | 84        | 42               |
| 7.000.000                             | 71        | 35,5             |
| 5.840.000                             | 65        | 32,5             |
| 4.670.000                             | 52        | 26               |
| 3.500.000                             | 41        | 20,5             |
| 2.330.000                             | 28        | 14               |
| 1.170.000                             | 11        | 5,5              |
| 0                                     | 0         |                  |

numération à la cellule : 4.670.000 hématies par mm<sup>3</sup>  
6.000 leucocytes par mm<sup>3</sup>

SANG XII

|           |    |      |
|-----------|----|------|
| 8.600.000 | 92 | 46   |
| 7.530.000 | 84 | 42   |
| 6.450.000 | 74 | 37   |
| 5.380.000 | 63 | 31,5 |
| 4.300.000 | 53 | 25,5 |
| 3.230.000 | 42 | 21   |
| 2.150.000 | 28 | 14   |
| 1.070.000 | 15 | 7,5  |
| 0         | 0  | 0    |

numération à la cellule : 4.300.000 hématies par mm<sup>3</sup>  
12.000 leucocytes par mm<sup>3</sup>

SANG XIII

|           |    |      |
|-----------|----|------|
| 9.800.000 | 90 | 45   |
| 8.580.000 | 81 | 40,5 |
| 7.350.000 | 72 | 36   |
| 6.150.000 | 63 | 31,5 |
| 4.900.000 | 52 | 26   |
| 3.650.000 | 40 | 20   |
| 2.450.000 | 27 | 13,5 |
| 1.220.000 | 14 | 7    |
| 0         | 0  | 0    |

numération à la cellule : 4.900.000 hématies par mm<sup>3</sup>  
5.000 leucocytes par mm<sup>3</sup>

La courbe ainsi obtenue nous a servi dans un grand nombre de vérifications; voici quelques résultats portés en points noirs sur la courbe d'étalonnage : (fig. 10)

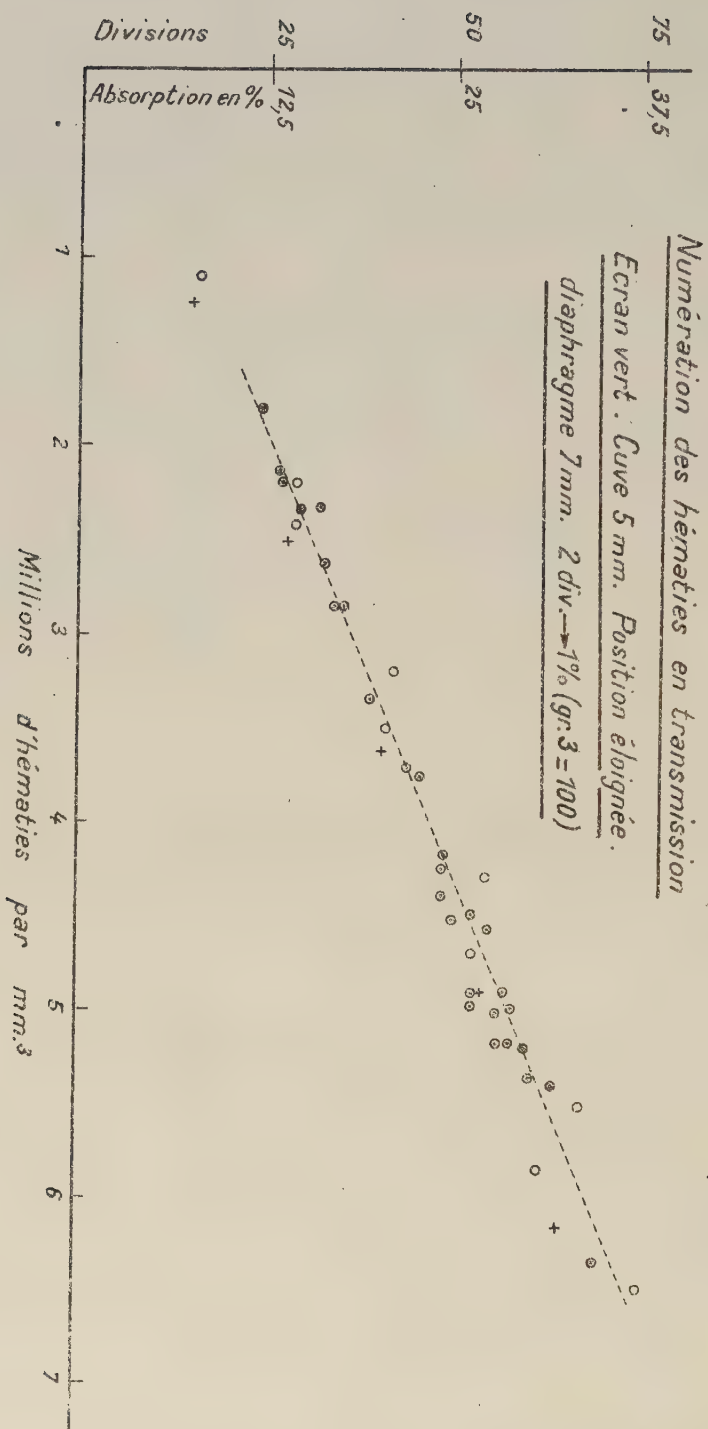


Fig. 10

| Hématies (par mm <sup>3</sup> ) | Leucocytes (par mm <sup>3</sup> ) | Divisions |
|---------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| 6.350.000                       | 7.500                             | 68        |
| 5.100.000                       | -                                 | 58        |
| 4.900.000                       | -                                 | 56        |
| 5.200.000                       | 19.000                            | 58        |
| 4.980.000                       | 6.500                             | 57        |
| 5.230.000                       | 18.500                            | 60        |
| 4.530.000                       | 6.000                             | 53        |
| 5.000.000                       | 9.000                             | 55        |
| 4.400.000                       | 9.000                             | 48        |
| 4.900.000                       | 5.000                             | 52        |
| 5.100.000                       | 7.000                             | 55        |
| 4.460.000                       | 8.000                             | 49        |
| 3.750.000                       | 7.500                             | 44        |
| 1.870.000                       | 7.500                             | 24        |
| 2.800.000                       | 11.000                            | 34        |
| 2.100.000                       | 10.500                            | 26        |
| 2.560.000                       | 8.000                             | 31        |
| 4.200.000                       | 4.500                             | 48        |
| 5.100.000                       | 6.000                             | 57        |
| 2.800.000                       | -                                 | 33        |
| 2.250.000                       | -                                 | 31        |
| 3.400.000                       | 7.000                             | 39        |
| 4.450.000                       | 5.500                             | 51        |
| 2.330.000                       | -                                 | 28        |
| 4.280.000                       | 7.500                             | 48        |
| 2.140.000                       | -                                 | 26        |

L'examen de ce tableau montre que l'écart maximum observé une fois correspondant à une erreur de 400.000 hématies par mm<sup>3</sup>, 150.000 représente l'erreur moyenne sur plus de 100 déterminations.

La technique photométrique en transmission paraissant satisfaisante nous avons effectué un certain nombre d'essais, en vue de préciser le rôle des facteurs les plus importants intervenant dans la variation de la densité optique.

#### 1° Influence de la taille et de la forme des Hématies

Nous avons constaté depuis longtemps qu'il était possible de modifier la forme des hématies en les rendant sphériques. Il suffit pour cela, d'effectuer la dilution de sang dans un liquide isotonique additionné d'une faible quantité d'une substance tensioactive, de sels biliaires par exemple. Une concentration de 0,1 gr p. 1000 est suffisante. Cette déformation des hématies est visible à l'ultramicroscope; elle peut être mise en évidence plus nettement par mesure de leur diamètre

moyen à l'aide du dispositif que nous décrivons plus loin. Le diamètre passe par exemple de  $7,5\mu$  à  $5,7\mu$ . Le calcul approximatif à l'aide de ces résultats des volumes des hématies, traduit bien une variation de forme à volume constant. Or les mesures effectuées dans ces conditions, avant et après ce traitement, montrent que les résultats en transmission et en diffusion n'ont pas changé quelle que soit la radiation incidente utilisée. En lumière verte par exemple, une dilution sans sels biliaires donnait une absorption de 27,5 p.100. Après addition de sels biliaires elle est de 27 p.100.

Il apparaît donc à la fois que la variation de forme et de taille à volume constant n'intervient pas dans nos conditions expérimentales.

## 2° Influence de la longueur d'onde

Si l'on considère une suspension d'hématies comme un milieu trouble purement diffusant, la théorie laisse prévoir l'absence d'effet chromatique, la densité optique devant être la même quelle que soit la longueur d'onde utilisée. Au contraire, si l'on admet qu'il peut y avoir pénétration de la lumière dans les hématies, avec absorption vraie due à l'hémoglobine, la densité optique doit être plus élevée dans la région verte du spectre.

Dans les conditions expérimentales précédemment décrites, la cuve étant loin du récepteur, la différence d'absorption pour les trois écrans est minime mais en faveur du vert :

|             |                 |              |                              |
|-------------|-----------------|--------------|------------------------------|
| Ecran rouge | : Wratten 29 F, | 53 divisions | soit 26,5 p.100 d'absorption |
| Ecran vert  | : Wratten 64    | 55 divisions | soit 27,5 p.100 d'absorption |
| Ecran bleu  | : Wratten 43    | 54 divisions | soit 27 p.100 d'absorption   |

Nous avons alors effectué les mesures en faisant varier les conditions expérimentales.

En transmission, en position de contact, les résultats sont très différents, l'absorption étant beaucoup plus forte dans le vert. La suspension précédemment utilisée, fournit les valeurs suivantes :

|             |               |                              |
|-------------|---------------|------------------------------|
| Ecran rouge | : 5 divisions | soit 2,5 p. 100 d'absorption |
| Ecran vert  | : 13 " "      | 6,5 p. 100 "                 |
| Ecran bleu  | : 4,5 " "     | 2,25 p.100 "                 |

Si l'on calcule le rapport R des absorptions pour les positions éloignées d  $\infty = 6$  cm. et de contact on trouve :

|             |         |
|-------------|---------|
| Ecran rouge | R = 11  |
| Ecran vert  | R = 4,2 |
| Ecran bleu  | R = 12  |

En réalité la distance de 6 cm est insuffisante avec le diaphragme utilisé, la densité optique augmenterait encore si l'on pouvait reculer la cuve.

Dognon avait déjà signalé que certaines cellules, hématies, levures, fournissaient des rapports beaucoup plus élevés que des particules de même taille, suspensions de mastic par exemple. Ceci fait supposer que dans le cas des hématies, il n'avait pas opéré en lumière verte.

En diffusion les résultats sont aussi nets. Pour une dilution à 1/500, on trouve les chiffres suivants :

|                 |              |
|-----------------|--------------|
| Lumière blanche | 57 Divisions |
| Ecran rouge     | 69 "         |
| Ecran vert      | 28 "         |
| Ecran bleu      | 45 "         |

Ces mesures en transmission au contact de la cellule, et en diffusion, font penser qu'il existe des rayons qui pénètrent à l'intérieur des hématies.

Pour le prouver, nous avons effectué des examens de spectre de diffusion, et de transmission de suspension d'hématies.

Sur un même cliché nous avons photographié successivement, à l'aide d'un spectrographe à prisme, le spectre d'une solution d'oxyhémoglobine, qui sert de référence, (dilution de sang à 1/200 dans l'eau) les spectres d'une suspension d'hématies à 1/200 dans du sérum physiologique d'abord en transmission, (les conditions optiques correspondent à la position éloignée du photomètre) puis en diffusion, par éclairage latéral de la cuve.

Alors qu'en transmission on ne constate pas la présence de bande, en diffusion apparaissent les deux bandes caractéristiques de l'oxyhémoglobine. (planche hors-texte, fig. 11)

Cette expérience permet de tirer les conclusions suivantes :

Lorsque l'on éclaire une suspension d'hématies avec un faisceau de lumière blanche, une partie de la lumière parvient directement sur le récepteur sans avoir rencontré d'obstacle, le reste est perdu; cette seconde partie comprend de la lumière qui a été diffusée par la membrane, et de la lumière qui, ayant pénétré dans les hématies, se trouve du fait de la forme de celles-ci répartie dans un cône de grande ouverture; il en résulte que par transmission, en position éloignée, une faible partie de ces radiations parvient au récepteur; au contraire, en position de contact et en diffusion, une grande partie est récupérée; comme cette lumière est appauvrie en radiations vertes, il en résulte une plus grande absorption apparente, et une plus faible diffusion dans le vert. Le schéma suivant rend compte de ce phénomène. (figure 12).

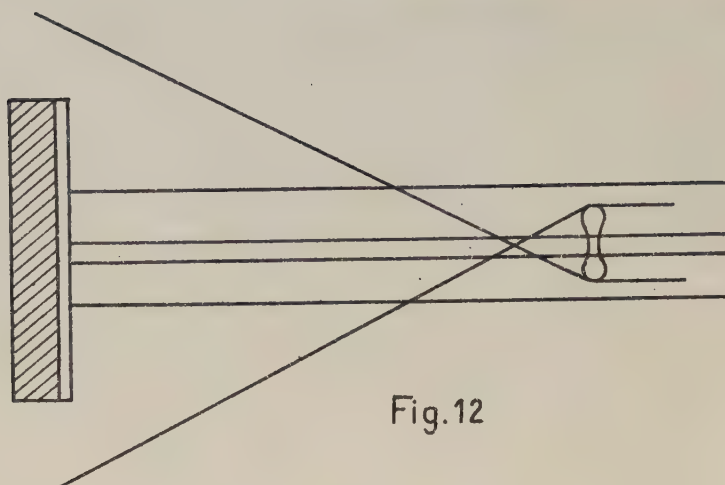


Fig.12

En outre, il est possible d'expliquer ainsi d'anomalie signalée par Dognon au sujet de la différence du rapport  $R$  pour les hématies et des particules de même taille. Le rapport élevé trouvé pour les hématies, (dans le rouge et dans le bleu surtout) traduit la transparence de celles-ci. Au contraire les grains de mastic qui sont vraiment opaques, présentent une absorption plus forte que les hématies dans la position de contact. Il faut donc remarquer que le rapport  $R$ , considéré par Dognon comme spécifique de la taille des particules, (un rôle plus restreint étant laissé aux indices de réfraction) peut être influencé par la plus ou moins grande transparence des grains.

### 3° Rôle des leucocytes

Bien que très diffusants, les leucocytes apparaissent beaucoup moins gênants qu'on aurait pu le supposer d'abord. Au cours de nos mesures, leur nombre, qui n'a pas dépassé 20.000 par  $\text{mm}^3$ , n'a pas été une cause d'erreur appréciable.

Il aurait été intéressant de pouvoir évaluer l'importance de l'erreur engendrée par ces éléments au cours d'une leucémie, mais nous n'avons pas pu nous procurer de sang d'un tel malade.

### 4° Rôle du liquide de dilution

Après avoir adopté au début de nos essais le liquide de Marciano, nous avons essayé un certain nombre d'autres liquides isotoniques. Des essais comparatifs ont été effectués avec le liquide Marciano frais et datant de 6 mois, avec le soluté injectable de chlorure de sodium et de sulfate de sodium du Codex (Hayem), avec le liquide de dilution proposé par Vernes (106), soluté de chlorure de sodium à 9 p.1000 formolé à 1p.100

avec des solutions de chlorure de sodium pur à 9, et à 6 p.1000. Les résultats sont très différents, en voici quelques exemples :

Sang contenant 4.900.000 hématies par mm<sup>3</sup>

Dilution à 1/2000

|                            |    |
|----------------------------|----|
| avec Marcano frais         | 55 |
| avec Marcano de 6 mois     | 54 |
| avec le liquide de Vernes  | 53 |
| avec le soluté de Hayem    | 49 |
| avec le chlorure de Sodium |    |
| à 9 p.1000                 | 45 |
| avec le chlorure de Sodium |    |
| à 6 p.1000                 | 40 |

La différence trouvée pour les trois premières suspensions peut être considérée comme négligeable. L'interprétation de ce phénomène n'est pas aisée. On pourrait invoquer l'existence de différences dans les indices de réfractions des liquides de dilution, mais elles restent faibles. Au réfractomètre d'Abbe nous avons trouvé à 17° les résultats suivants :

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Liquide de Marcano           | 1,3368 |
| Liquide de Vernes            | 1,3345 |
| Soluté de Hayem              | 1,3342 |
| Soluté de chlorure de Sodium |        |
| à 9 p.1000                   | 1,3340 |

Toutefois la plus grande partie des écarts peut sans doute être rapportée à la différence de constitution ionique des solutés de dilution.

#### CONCLUSION

La numération des hématies peut être effectuée aisément par mesure de la densité optique d'une dilution convenable de sang, en plaçant la cuve loin du récepteur (condition réalisée par la plupart des photomètres); on peut opérer indifféremment avec n'importe quel écran sélectif. En revanche on devra toujours utiliser le même soluté de dilution, soit le liquide de Marcano, soit celui préconisé par Vernes. La précision obtenue est au moins égale à celle de l'hématimètre.

Il paraît intéressant de signaler une anomalie que nous avons rencontrée une seule fois et pu suivre pendant quelques jours. Il s'agit du sang d'une jeune fille bien portante, n'ayant subi aucun traitement médicamenteux, présentant des hématies très réfringentes dans la proportion de 95 p.100, ce phénomène très net au microscope, rendait totalement impossible la numération des leucocytes sur la même dilution. A

la photométrie, l'erreur était considérable, tant en diffusion qu'en transmission; elle atteignait un million par  $\text{mm}^3$ . Nous avons suivi le sang de ce sujet pendant deux semaines, et avons assisté à la diminution progressive, puis à la disparition des hématies réfringentes; parallèlement la numération par photométrie devenait normale. Il aurait été intéressant de pouvoir étudier plus complètement des sangs identiques mais nous n'avons pas pu en trouver. Il nous a été signalé par ailleurs un phénomène semblable chez un malade traité par un antihistaminique de synthèse.

La rédaction de ce chapitre était terminée lorsque nous avons eu connaissance de deux publications de A. DOGNON et Mademoiselle SIMONOT, concernant également la numération photométrique des hématies (33) (34).

Ils envisagent le problème à la fois des points de vue théorique et pratique.

Considérant le rôle de la longueur d'onde de la radiation incidente, ils concluent comme nous l'avons fait, à l'absence d'effet chromatique en transmission, si la cuve est placée loin du récepteur (ils n'envisagent pas la diffusion). L'hématie se comporte dans ces conditions comme un grain opaque.

A. DOGNON et Mademoiselle SIMONOT discutent ensuite du rôle de la taille des hématies et provoquent des déformations de celles-ci (difficiles d'ailleurs à préciser) en augmentant la concentration en sels du liquide de dilution. Ils ne trouvent pas de différence sensible, pourtant leur graphique d'étalonnage comporte deux courbes, très voisines il est vrai, la première se rapportant à des hématies de 7 à  $7,5\mu$ , la seconde à celles de 8 à  $9\mu$ .

Il est difficile de conclure si la taille est le seul facteur qui peut intervenir, le rôle de l'indice de réfraction de la membrane n'étant pas négligeable.

Ces auteurs soulèvent ensuite un problème théorique intéressant. Ils admettent avec raison, que la réduction d'intensité que subit un faisceau traversant une suspension d'hématies est due à la fois, à une diffusion, et à de la diffraction.

Ils considèrent que de ce fait, la surface optique est double de la surface géométrique des hématies, qui elle, est égale à  $n\pi r^2$ . En réalité, il faut faire intervenir une aire projective moyenne, les hématies n'étant pas toutes perpendiculaires à l'axe du faisceau. En utilisant dans les calculs  $2\pi r^2 n$ , A. DOGNON et Mademoiselle SIMONOT attribuent à la diffraction un rôle aussi important qu'à la diffusion.

Une telle hypothèse nous paraît difficilement acceptable, car

l'énergie totale répartie dans les anneaux de diffraction n'est jamais considérable. D'ailleurs la vérification effectuée par eux-mêmes, sur des hématies sédimentées à plat, sur une cuve horizontale traversée par un faisceau vertical, (la surface géométrique est alors facile à calculer) montre qu'il faut faire intervenir  $\pi r^2 n$  plutôt que  $2\pi r^2 n$ .

Ils pensent que cette différence est due à la transparence des hématies sédimentées à plat, et semblent admettre que 50 p.100 de la lumière incidente les traverse dans leur région médiane.

Il nous semble infiniment plus probable que la perte par diffraction est très faible, et se trouve à peu près compensée par une transparence des hématies également minime.

A priori, le problème ne nous paraît pas impossible à résoudre.

Du point de vue pratique, les résultats de DOGNON semblent moins précis que les nôtres; il les explique par des erreurs fortuites dans les dilutions et les numérations hématimétriques. Nous avons montré par un exemple qu'il y a quelquefois des causes plus importantes liées à la structure même de certaines hématies.

DOGNON et Mademoiselle SIMONOT signalent enfin la précision beaucoup plus grande qu'ils ont obtenue en faisant leurs mesures photométriques sur une cuve horizontale de 0,2mm. d'épaisseur; ils utilisent dans ce but un hématimètre ordinaire sur lequel ils pratiquent également la numération au microscope.

Ainsi donc, la confrontation de nos résultats avec ceux de A. DOGNON et Mademoiselle SIMONOT confirme l'intérêt de la numération photométrique des hématies, dans des conditions de précision au moins égale à la méthode hématimétrique, et soulève un problème théorique qu'il serait intéressant de résoudre.

## 2° MESURE DU DIAMETRE MOYEN DES HEMATIES

La mesure du diamètre moyen des hématies, constitue pour le médecin une détermination excellente pour le diagnostic de certaines hémopathies, en particulier de l'anémie macrocytique d'Addison-Biermer, des anémies microcytiques, de l'ictère hémolytique congénital par exemple. Elle permet en outre, de suivre l'évolution de la maladie, de connaître rapidement la valeur d'une thérapeutique.

La technique la plus classique, employée encore dans la plupart des laboratoires d'hématologie, consiste à effectuer la mesure directe du diamètre des hématies sous le microscope, à l'aide d'un oculaire micrométrique. Ce procédé apparemment simple, est en réalité assez délicat.

Il consiste en la mesure sur une lame de sang sec en général à l'aide d'un microscope de grossissement connu, du diamètre d'un certain nombre d'hématies. On utilise en général l'objectif à immersion. Alors que pour un sang normal, il suffit de déterminer les diamètres de quelques dizaines d'hématies pour obtenir un résultat satisfaisant, il est nécessaire d'en mesurer un grand nombre dès qu'il y a anisocytose. En outre, à la déformation inévitable des hématies au cours de leur étalement et du séchage rapide de la préparation, vient s'ajouter une tendance à l'inégale répartition des éléments de différentes tailles le long de la lame; le résultat trouvé risque alors de dépendre des champs dans lesquels les mesures ont été faites. Pour y remédier, il est nécessaire de répéter la mensuration en divers points de la préparation, sur un total d'au moins 500 hématies. Un tel examen devient alors long, fastidieux et fatigant. Price-Jones (95), qui insista l'un des premiers sur l'intérêt de cette détermination, proposa d'en traduire le résultat sur un graphique représentant la fréquence des hématies de chaque taille. Un tel diagramme renseigne sur le diamètre moyen et sur le degré d'anisocytose. Si utile qu'il soit, ce procédé reste malgré tout peu commode.

Pourtant, en 1919, Pijper avait découvert une méthode permettant de déterminer d'un seul coup le diamètre moyen des hématies et de donner un résultat portant sur plusieurs milliers de cellule (86) (87).

Cette méthode est basée sur la diffraction de la lumière à travers une lame de sang convenablement préparée. Elle consiste à étudier, dans des conditions géométriques précises, les halos que produisent les hématies par diffraction de la lumière sur leurs bords.

Un petit faisceau lumineux de quelques millimètres de diamètre, rencontre normalement une lame de verre qui porte l'étalement; il est ensuite focalisé en un point; on observe alors, dans le plan focal, des halos dont le diamètre varie en sens inverse de ceux des hématies. Des érythrocytes de grandes taille fournissent des anneaux petits et inversement.

Sur ce principe sont basé divers appareils qui se trouvent actuellement dans le commerce. Le plus ancien a été construit sur les indications de l'auteur de la méthode, par Zeiss (88). Plus récemment, en 1947, un modèle plus commode a été réalisé par Tzanok et Bessis (105), sur les données de Mlle Flamant et M. Arnulf (38). Ces appareils apportent plutôt des moyens d'études cliniques que des méthodes de recherches précises. C'est dans ce dernier but essentiellement, que nous avons réalisé avec Mr. Guillot en 1944, à l'hôpital Broussais un appareil plus précis, mais plus compliqué que les précédents.

Nous exposerons d'abord le principe de cette méthode de mesure; nous décrirons ensuite les appareils de Pijper, de Tzanok et Bessis, puis le nôtre; nous indiquerons ensuite les résultats que nous avons obtenus et

les remarques que l'emploi de cet appareil nous a suggérées.

### Interprétation théorique de la méthode

L'image d'un point lumineux situé à l'infini, que fournit une lentille, dont l'ouverture est limitée par un diaphragme, se présente, par suite de la nature ondulatoire de la lumière, sous la forme d'un disque central lumineux entouré d'un système d'anneaux alternativement sombres et clairs. Une relation simple permet de calculer l'ouverture du diaphragme, en fonction de la longueur d'onde de la lumière, de la distance focale de la lentille, et du diamètre du premier anneau noir. Si l'on considère au lieu de l'ouverture unique, un grand nombre de petits trous répartis au hasard, on obtient un phénomène identique, plus intense. Le même raisonnement peut s'appliquer si l'on considère un écran transparent portant de nombreuses petites taches sombres. C'est ce qui se passe dans le cas d'un étalement d'hématies, quand celles-ci sont juxtaposées sans former de piles.

Pour des hématies plates et opaques, on peut appliquer la théorie classique du réseau. Si l'on considère deux rayons parallèles frappant un réseau au niveau de deux espaces transparents voisins, distants du paramètre  $a$ , et si l'on reçoit les rayons diffractés sur une lentille  $L$ , on obtiendra un point lumineux en  $F$ , quand la différence de marche entre les deux rayons sera égale à un nombre entier de longueurs d'onde.

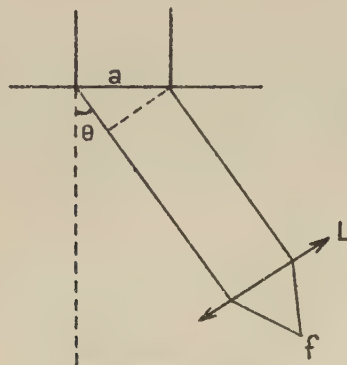


Fig.13

On peut écrire la relation :

$$a = n \cdot \lambda \cdot \sin. \theta .$$

L'angle  $\theta$  est défini par la distance qui sépare la tache centrale des anneaux concentriques. Dans le cas d'une hématie, la diffraction s'effectuant sur ses bords, on mesure donc ainsi son diamètre. Pour un

écran opaque, le renforcement se produit pour des différences de marche égales à  $\lambda$ ,  $2\lambda$ ,  $3\lambda$  ; à chacune correspond un anneau d'ordre de plus en plus élevé.

Si l'on considère l'hématie comme un petit disque transparent, la diffraction s'effectue selon le schéma suivant :

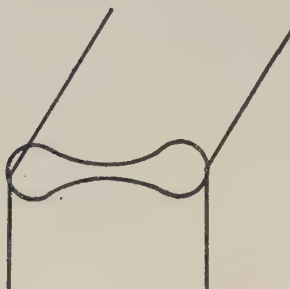


Fig.14

Un des rayons se réfléchit à l'intérieur, l'autre à l'extérieur; il en résulte deux réflexions de signe inverse d'où production d'anneaux pour des différences de marche égales à  $\frac{\lambda}{2}$ ,  $\frac{3\lambda}{2}$ ,  $\frac{5\lambda}{2}$

Le schéma suivant montre la variation du rayon de l'anneau de diffraction R en fonction du diamètre de l'hématie d, (la distance AO qui représente la distance entre la préparation et le lieu d'observation des anneaux et la différence de marche AC sont constantes).

Voir figure 15 page 42.

Si l'on utilise comme source, un dispositif produisant des radiations monochromatiques, on obtient autour de la tache lumineuse centrale une série d'anneaux concentriques d'ordres successifs, qui diminuent d'intensité vers la périphérie. Ces anneaux seront d'autant plus flous, que les diamètres des hématies seront plus variés. Avec la lumière blanche au contraire, par suite de la dispersion, on obtient une série de petits spectres, les radiations violettes moins déviées se trouvant plus près du centre.

#### Réalisation pratique des appareils

Les différents appareils comprennent tous une source intense, ponctuelle, placée au foyer d'un collimateur fournissant un faisceau de lumière parallèle, celui-ci parvient sur une lentille convergente

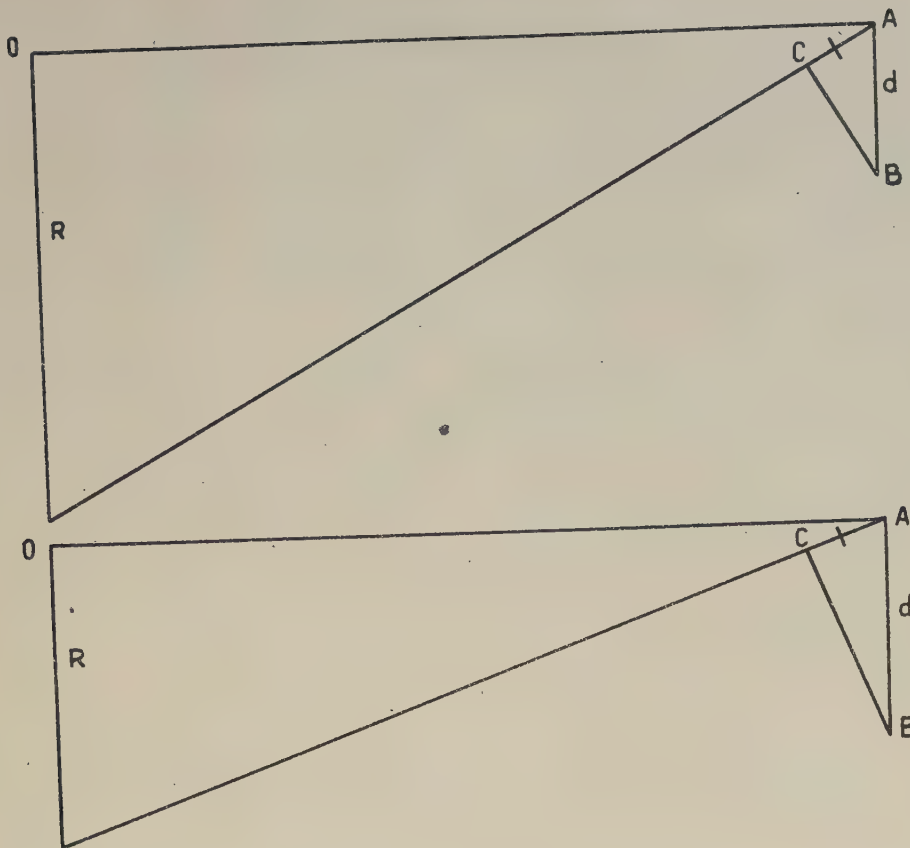


Fig.15

au foyer duquel se trouve le système d'observation. La préparation se place entre le collimateur et la lentille, dans une position fixe.

#### Appareil de Pijper

Ses particularités sont les suivantes :

- 1° - emploi de la lumière blanche;
- 2° - division du faisceau en deux plages juxtaposées semi-circulaires permettant de comparer deux lames entre elles;
- 3° - verre dépoli formant écran d'observation;
- 4° - distance focale de la lentille de 20 cm.

La mesure s'effectue empiriquement, par rapport à une lame étalon ou en se rapportant à un tableau donnant la correspondance entre les diamètres des hématies et ceux des anneaux pour différentes longueurs

d'onde (choisies assez approximativement) (89).

#### Appareil de Tzanck et Bessis

Il est de dimensions très réduites et présente les deux particularités suivantes :

1° - on utilise un écran sélectif vert ce qui permet d'obtenir une série d'anneaux sombres et clairs concentriques.

2° - l'observation des anneaux se fait à l'aide d'un oculaire portant dans son plan image un micromètre directement gradué en  $\mu$ . Les auteurs ne donnent aucune indication sur l'étalonnage de leur appareil; il est effectué sans doute par rapport à la méthode microscopique.

Pour ces deux appareils la précision ne dépasse pas  $0,4 \mu$ , ce qui est d'ailleurs suffisant en clinique.

#### Appareil personnel

Il est beaucoup plus volumineux. Il utilise :

1° - une radiation monochromatique verte ou violette, fournie par une lampe à vapeur de mercure sous pression (type Mazda M A 300), et isolée par des filtres appropriés. Pour le violet, on emploie l'écran Wratten n° 50, pour le vert, un écran vert-jaune Wratten n° 64, laissant passer également les radiations jaunes. On adopte de ce fait comme longueur d'onde :

radiations violettes :  $454 \text{ m}\mu$ .  
radiations vert-jaune :  $= 562 \text{ m}\mu$ . (valeur moyenne)

2° - un collimateur comprenant deux diaphragmes successifs, l'un de 0,6 mm de diamètre, l'autre de 1 mm., et une lentille.

3° - un prisme à réflexion totale renvoyant le faisceau dans le sens vertical.

Voir figure 16, page 44.

4° - une lentille convergente de distance focale égale à 138 mm.

5° - un verre dépoli pour l'observation, auquel on peut substituer un châssis photographique de format 9 x 12.

Les plaques qui nous ont donné les meilleurs résultats sont :

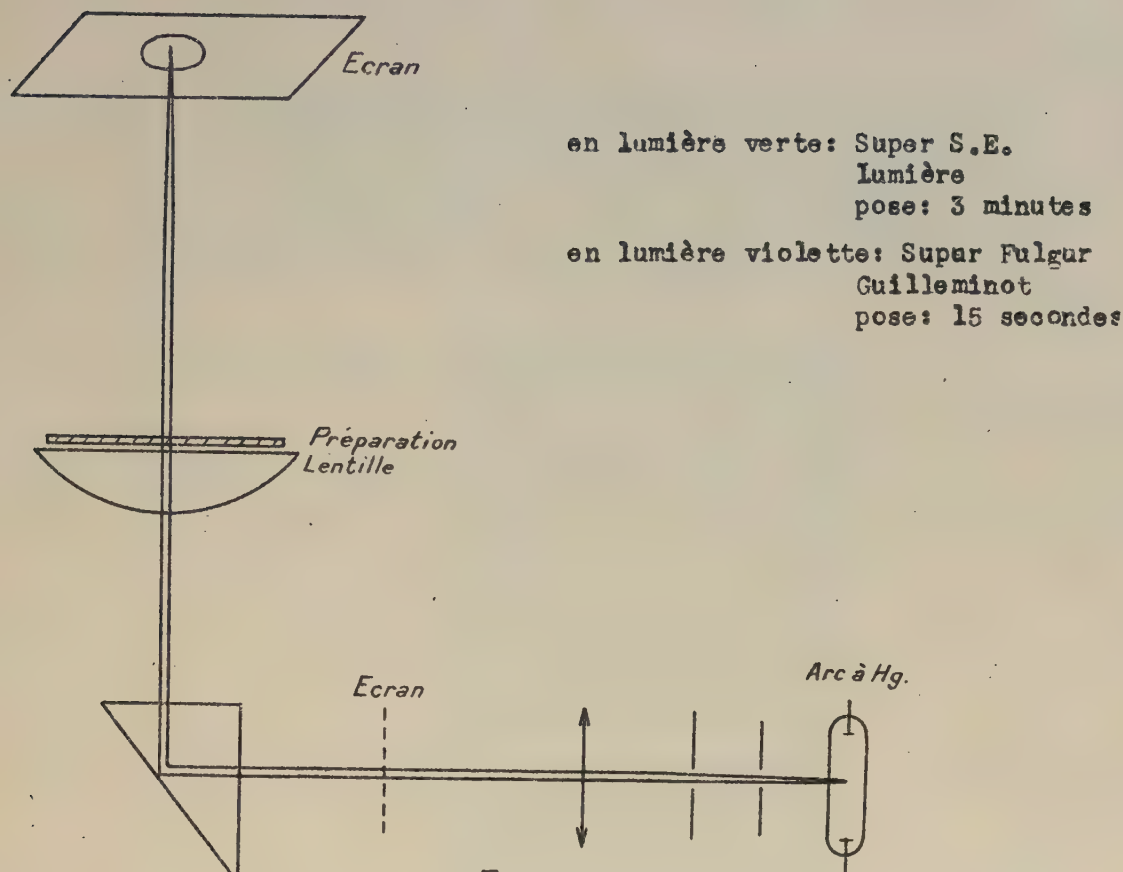


Fig. 16

Le tableau ci-joint représente les photographies grandeur naturelle de trois lames différentes (figure 17, planche hors-texte).

#### Résultats obtenus; difficultés d'interprétation

Comme les auteurs précédents, nous nous sommes contentés tout d'abord d'un étalonnage empirique à l'aide de lames déjà étudiées par méthode microscopique. Nous remercions vivement le Docteur Lavergne qui nous a procuré aimablement les lames nécessaires à cet étalonnage.

Nous avons envisagé ensuite le calcul direct du diamètre, à partir des dimensions de l'anneau, et des conditions géométriques.

Pour cela, il fallait savoir:

- 1° - L'ordre du premier anneau visible
- 2° - Si l'hématie se comportait comme un écran opaque ou comme un disque transparent.

Dans la première hypothèse, il faut faire intervenir dans le calcul,  $\lambda$  ou  $2\lambda$  ou  $3\lambda$  dans la seconde  $\frac{\lambda}{2}, \frac{3\lambda}{2}, \frac{5\lambda}{2}$ .

L'examen des valeurs numériques fournies par les différents modes de calcul possibles tend à faire admettre:

- 1° - que le premier anneau visible est du 2ème ordre, le suivant du 3° ordre, l'anneau du premier ordre étant confondu avec la tâche centrale.
- 2° - que les réflexions sont de sens inverse, suivant le schéma de la page 41.

Le premier anneau visible semble donc correspondre à une différence de marche de  $\frac{3\lambda}{2}$ .

La comparaison des résultats trouvés pour les anneaux de 2ème et 3ème ordre, en lumière verte d'une part, et en lumière violette d'autre part, avec des étalements secs est en faveur de ce calcul.

La figure 16 permet d'établir la relation:

$$d = \frac{\lambda}{R} \times OA$$

#### Sang I

|               |                        |             |             |
|---------------|------------------------|-------------|-------------|
| lumière verte | : anneau de 2ème ordre | 34 mm. soit | $6,87\mu$ . |
|               | anneau de 3ème ordre   | 56 mm. soit | $6,95\mu$ . |

#### Sang IV

|                   |                      |             |             |
|-------------------|----------------------|-------------|-------------|
| lumière violette: | anneau de 2ème ordre | 28 mm. soit | $6,85\mu$ . |
|                   | anneau de 3ème ordre | 45 mm. soit | $6,95\mu$ . |
|                   | anneau de 4ème ordre | 62 mm. soit | $6,97\mu$ . |

mesure directe au microscope:  $7\mu \pm 0,2$

#### Sang V

lumière violette:  $7,25\mu$

Contrôle au microscope:  $7,2\mu \pm 0,2$

#### Sang VI

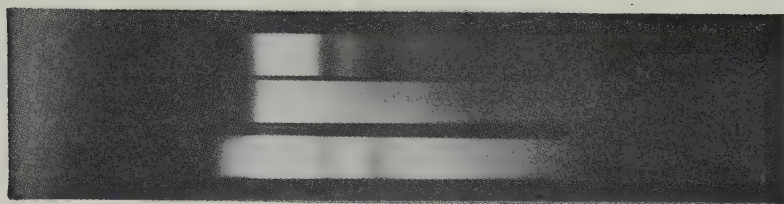
lumière violette:  $6,50\mu$

Contrôle au microscope:  $6,4\mu \pm 0,2$

Le phénomène de diffraction intéresse environ 10.000 hématies.

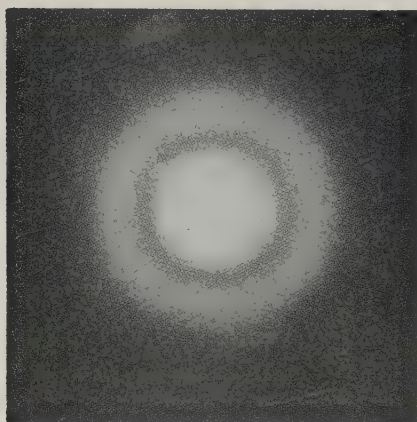
La courbe ci-jointe donne directement les diamètres des hématies en fonction de ceux des anneaux en lumière verte ou violette (anneaux de 2ème ordre). (figure 18).

FIG. 11

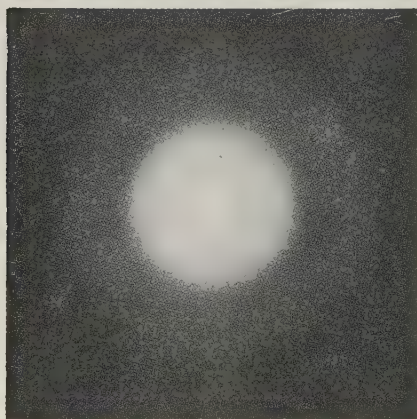


RADIATIONS VERT-JAUNE  
(anneau clair)

diamètre 8,65  $\mu$



diamètre 6,70  $\mu$



diamètre 5,90  $\mu$

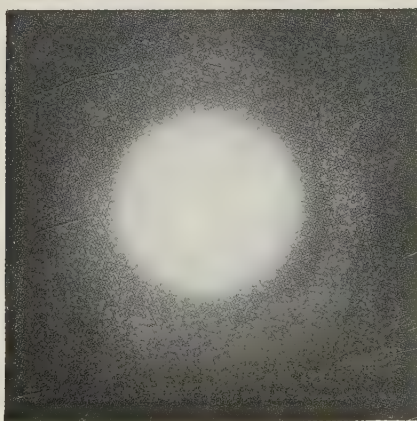


FIG. 17



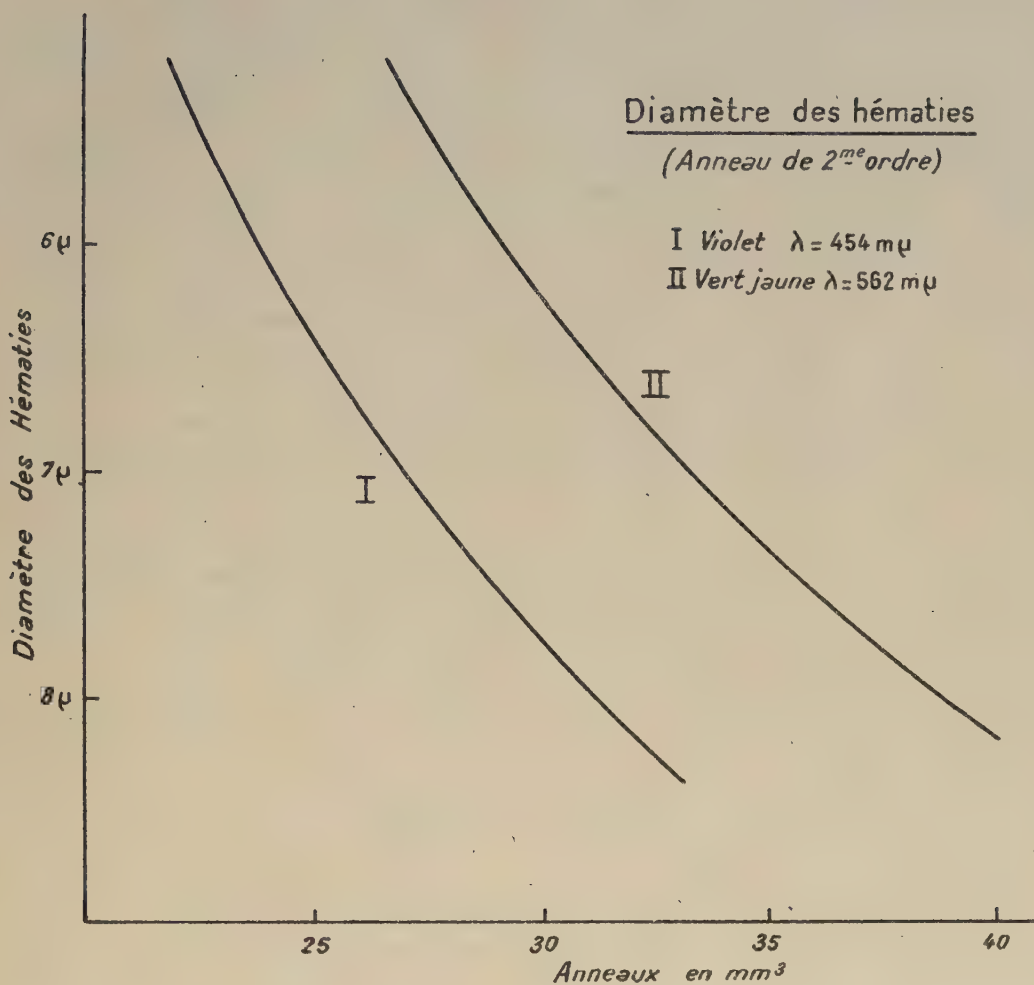


Fig.18

La mesure de l'anneau peut se faire directement sur le cliché, à 1 mm près ou avec plus de précision en l'agrandissant 4 fois à l'aide d'un agrandisseur photographique et en déterminant le diamètre de l'image obtenue.

Le calcul précédent s'étant révélé logique, il nous a semblé intéressant de voir s'il s'appliquait sur des hématies non desséchées c'est-à-dire épaisses d'environ  $2,2 \mu$  ; il pouvait être utile également de savoir la variation de taille que pouvait subir les hématies au cours du séchage de la préparation.

Nous avons pratiqué les mesures sur le sang frais, après dilution de celui-ci dans une solution de chlorure de sodium à 9 gr. %/... Sur une lame, on place une grosse goutte de cette solution, et prélève par piqûre au doigt à l'aide d'un vaccinostyle stérile, une petite goutte de sang le long d'un côté d'une lamelle. Le sang est soigneusement dilué dans la solution, afin de libérer les hématies les unes des autres, condition indispensable pour obtenir des anneaux nets. Si la dilution est bien faite, on doit observer sur la lame des zones irisées. On laisse les hématies se sédimenter pendant une ou deux minutes, puis procède à la mesure. On doit rechercher sur le verre dépoli la région de la préparation qui correspond aux anneaux les plus lumineux. Pour l'examen visuel, on a intérêt à opérer en lumière blanche et à mesurer le diamètre de l'anneau violet. Pour faire un cliché, on dispose un filtre convenable sur le trajet du faisceau et substitue un châssis photographique au verre dépoli.

Les mesures doivent être faites dans un délai maximum de 15 minutes, on observe plus tard une diminution de la netteté des anneaux due à une déformation des hématies qui à l'ultramicroscope apparaissent crénelées.

Les résultats obtenus sont encore ici favorables au calcul proposé; ils prouvent en outre la réduction de diamètre que subit l'hématie en séchant.

Sang II

Frais:  $6,87\mu$ .  
Sec :  $6,48\mu$ .

Sang IV

Frais:  $6,98\mu$ .  
Sec :  $6,85\mu$ .

Sang VII

Frais:  $7,40\mu$ .  
Sec :  $7,10\mu$ .

Il semble donc normal, lorsqu'on désire un résultat précis, d'effectuer la mesure du diamètre moyen sur des hématies en suspension dans un liquide isotonique. Nous avons eu l'occasion d'observer en effet sur une même lame de sang, une notable différence de diamètre moyen suivant la zone observée.

Sang VIII

1<sup>er</sup> Point :  $7,3\mu$ .  
2<sup>ème</sup> Point :  $6,9\mu$ .

Désirant savoir ce qui se passait dans le cas de sphérocytes, nous avons provoqué la transformation des hématies en sphères par addition au liquide de dilution de 0.1 gr. pour 1000 de sels biliaires. La diminution de diamètre est immédiate, et visible à l'ultramicroscope. Nous pensions dans ce cas que le calcul précédemment admis ne pouvait pas être valable; on ne peut assimiler une telle sphère à un disque plat comme dans le cas précédent. D'autre part, si l'on fait intervenir l'aire projective de l'hématie, il n'est plus possible alors d'utiliser le même calcul: on doit la considérer comme un écran opaque, les réflexions se faisant sans changement de sens. Pourtant, ici encore, le calcul se justifie.

#### Sang VII

|                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| Frais normal              | 7,4 $\mu$         |
| Frais avec sels biliaires | 5,7 $\mu$         |
| Contrôle microscopique    | 7,1 $\mu \pm 0,2$ |
|                           | 5,5 $\mu \pm 0,2$ |

#### Sang A

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Frais normal              | 7,8 $\mu$ |
| Frais avec sels biliaires | 6,1 $\mu$ |

Si l'on calcule les volumes approximatifs des hématies pour ces 2 formes, on obtient des résultats sensiblement identiques qui traduisent une variation de forme à volume constant. On prend pour le calcul des valeurs suivantes:

1° Cas: On assimile l'hématie à un petit cylindre de 3,9  $\mu$  de rayon et de 2,2  $\mu$  environ d'épaisseur (Lavergne 65) soit 105  $\mu^3$  environ.

2° Cas: Sphère de 3,0  $\mu$  de rayons soit 110  $\mu^3$  environ

L'explication qui permettra de justifier théoriquement l'application du calcul précédent aux hématies reste encore à trouver.

#### CONCLUSION

La méthode que nous avons utilisée pour déterminer le diamètre des hématies fournit un résultat moyen portant sur 10.000 d'entre elles environ, avec une précision d'au moins 0,1  $\mu$ . Elle nous a permis de mettre en évidence la diminution du diamètre des hématies lors du séchage des étalements.

L'emploi d'une méthode de calcul valable pour les hématies à l'état frais ou à l'état sec permet en outre de s'affranchir d'un étalonnage délicat.

### 3°- DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

Nous avons entrepris ici de préciser un point particulier du dosage colorimétrique de l'hémoglobine, pour compléter les résultats que nous avons déjà obtenus avec Mr. Guillot (50) (51).

Nous avons comparé alors, les résultats de la méthode volumétrique par dosage du fer, de P. Fleury et Marque, (39), et de la méthode colorimétrique de Dognon (35). Cet auteur mesurait la densité optique d'une solution d'hémoglobine en lumière verte monochromatique (raie du mercure). Les résultats fournis par ces deux méthodes s'étaient révélées identiques (50), à la condition toutefois de ne pas omettre de clarifier soigneusement la dilution de sang. Sans cette précaution on trouve un chiffre nettement plus élevé par colorimétrie; Chevallier, Fiehrer et Mlle Saizou (20) ont confirmé cette erreur en comparant les techniques de Dognon et de Gowers.

Nous avons montré ensuite avec M. Guillot (51) le rôle de la nature de la source dans le dosage selon Dognon. En effet, malgré la différence des spectres d'absorption de l'oxyhémoglobine, de la carboxyhémoglobine, de l'hémoglobine réduite, celles-ci produisent des absorptions identiques en lumière verte du mercure. Dans les mêmes conditions, le dosage est troublé par la présence de méthémoglobine.

Or, plusieurs auteurs, Piette en particulier (84), ont utilisé cette méthode colorimétrique pour le dosage de l'hémoglobine à l'aide de divers électrophotomètres. Ils opèrent en lumière verte non monochromatique comme Dognon, mais simplement sélectionnée par un écran vert.

Il nous a paru utile de vérifier, à l'aide de notre électrophotomètre muni de son écran vert, (Wratten N° 64), l'influence de l'état de l'hémoglobine sur l'absorption.

Nous avons utilisé une dilution de sang à 1/250 soigneusement clarifiée par centrifugation.

Dans quatre échantillons nous avons transformé l'hémoglobine oxyhémoglobine par un courant d'oxygène, en carboxyhémoglobine par un courant de gaz d'éclairage, en hémoglobine réduite par l'hydrosulfite de sodium, en méthémoglobine par le nitrite de sodium.

La mesure de l'absorption pour différentes solutions, à l'aide du photomètre de Dognon et d'un colorimètre de Duboscq en lumière verte du mercure a donné les résultats suivants :

#### Colorimètre de Duboscq

Raie verte du mercure

Ecran gris de comparaison de densité optique égale à 0,83

Dilution à 1/250

|                     |          |      |
|---------------------|----------|------|
| Oxyhémoglobine      | (en mm.) | 10   |
| Carboxyhémoglobine  | "        | 10   |
| Hémoglobine réduite | "        | 10   |
| Méthémoglobine      | "        | 14,5 |

Photomètre de Dognon

Ecran vert (Wratten 64)

Cuve : 5 mm. en position de contact

Sensibilité : 1 p.100 d'absorption = 2 divisions

Dilution à 1/250

|                     |              |                            |   |
|---------------------|--------------|----------------------------|---|
| Oxyhémoglobine      | 92 divisions | soit 46 p.100 d'absorption |   |
| Carboxyhémoglobine  | 100 "        | 50 "                       | " |
| Hémoglobine réduite | 91 "         | 45,5 "                     | " |
| Méthémoglobine      | 78 "         | 39 "                       | " |

L'examen de ce dernier tableau montre que dans les conditions où nous avons opéré (écran vert Wratten 64), le résultat n'est pas influencé par la présence en proportion variable d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine réduite; il l'est facilement dans le cas où la dilution contient de la carboxyhémoglobine et fortement en présence de méthémoglobine. Nous nous trouvons donc à peu près dans les mêmes conditions qu'en lumière verte monochromatique.

Il sera utile cependant, lorsque l'on utilisera un écran différent, de vérifier la similitude de résultat entre l'oxyhémoglobine, l'hémoglobine réduite et la carboxyhémoglobine. A priori un écran vert jaune sera préférable à un écran vert bleu.

## B. - ETUDE DE QUELQUES MICRO-METHODES EN CHIMIE BIOLOGIQUE

Nous avons étudié plus particulièrement les micro-méthodes correspondant à quelques dosages fréquemment demandés dans les services hospitaliers de pédiatrie.

Nous envisagerons ici :

- 1° - Le micro-dosage des protides dans le sérum.
- 2° - Le micro-dosage du sodium dans le sérum ou le plasma.
- 3° - Le micro-dosage de l'urée dans le sérum ou le plasma.

### I - MICRO-DOSAGE DES PROTIDES DU SERUM

Nous rappellerons d'abord, le principe des techniques utilisées pour le dosage des protides; nous indiquerons ensuite les méthodes que nous avons expérimentées en vue de mettre au point une micro-méthode pratique, et proposerons une technique personnelle de dosage de la sérum-albumine et de la sérum-globuline sur 0,1 cm<sup>3</sup> de sérum.

#### A) - RAPPEL DES METHODES GENERALES

Nous ne ferons qu'un bref rappel des différents principes qui sont à la base de techniques multiples, un exposé complet ayant été fait récemment par M. de Traverse et R. Depraitère au congrès de la Société de Biologie Clinique (104). Nous indiquerons les techniques où l'on dose les protides totaux, puis celles qui permettent d'évaluer séparément la sérum-albumine et la sérum-globuline.

##### a) Dosage des protides totaux

On emploie des techniques physiques, chimiques, colorimétriques ou néphélométriques.

##### 1) Méthodes physiques

La réfractométrie, bien étudiée par Reiss (97) dès 1904, a été utilisée depuis avec des faveurs très diverses; en effet, à côté de cer-

tains avantages incontestables, rapidité des mesures, faible quantité de prise d'essai, elle présente l'inconvénient d'être troublée par d'autres substances existant dans le sérum à des taux variables. Si la présence de l'urée n'est pratiquement pas gênante, il n'en est pas de même des lipides. Ces substances, très réfringentes occasionnent une erreur par excès qui d'après Ch. O. Guillaumin, Wahl et Mlle Laurençin (48) est d'autant plus grande que la teneur en lipides est plus élevée. Constatant une erreur par excès dans la plupart des cas, Achard, Grigaut et Codounis (1) estiment que le chiffre fourni par les tables de Reiss (97) correspond à la somme protides + lipides. Cette remarque ne se vérifie bien que si le taux des lipides reste inférieur à 10 gr. p.1000; en moyenne l'erreur sur l'évaluation des protides est de 8 à 10 p.100.

Malgré des modifications apportées aux formules et les travaux de Roher, de Hand (52) entre autres, la méthode réfractométrique reste assez peu précise.

La densimétrie est à la base de quelques micro-méthodes plus ou moins pratiques.

On peut, suivant Lowry et Hunter (68) superposer dans un tube deux liquides de densité différente, que l'on agite dans des conditions déterminées.

Il se crée à la surface de séparation un gradient de densité; si l'on fait tomber une goutte de sérum, elle prendra dans cette zone une position d'équilibre; la densité sera alors évaluée par rapport à des liquides témoins.

Poloncvski et Nordmann (93) ont proposé de mesurer la vitesse de chute d'une goutte de sérum dans un liquide non miscible, de densité connue; de telles mesures si précises soient-elles ont l'inconvénient de nécessiter l'emploi d'un cathétomètre.

Plus simple est la méthode de Phillips et Van Slyke (83) (36) dite "méthode au sulfate de cuivre". Elle consiste à faire tomber quelques gouttes de sérum dans les flacons contenant des solutions de sulfate de cuivre de densités variées. Lorsque la goutte reste en équilibre dans un des flacons, on dit que les densités sont égales. La pellicule qui se forme au contact de la goutte et du liquide, n'influe pas sur le résultat; il en est de même du rapport sérum-albumine/sérum-globuline (80)

Rappelons enfin l'intérêt que présente l'étude électrophorétique du sérum, qui est trop délicate pour être utilisée en analyse médicale. Elle demeure encore une méthode de recherche (70) (77).

## 2) Méthodes chimiques

Les plus anciennes consistent à peser les protides totaux après

précipitation et lavage, destinés à éliminer les sels et les lipides. Elles nécessitent au moins 1 cm<sup>3</sup> de sérum. KAYSER (57) utilise un mélange d'alcool et d'acétone, HARLAY l'éther et l'acétone, PIETTRE (85) et ADNOT (2) l'acétone, DELSAL (22) le méthylal et le méthanol.

Les techniques azotométriques sont également très employées. Elles consistent en un dosage d'azote suivant KJELDAHL; elles permettent des prélèvements restreints; la difficulté réside dans l'adoption d'un coefficient de conversion moyen de l'azote en protides (41) (47) (49). Malgré les critiques de ces derniers auteurs, le dosage est très satisfaisant. L'évaluation de l'ammoniaque est faite, soit par volumétrie, soit par colorimétrie, à l'aide de la réaction de NESSLER (24).

Les méthodes photométriques évaluent des colorations fournies par les protéines, ou par certains acides aminés; la difficulté tient alors à la teneur irrégulière des différents protides en amino-acides; en revanche, elles se prêtent bien aux micro-méthodes.

La réaction du biuret proposée par KINGSLEY (61) et FINE (37) a été adoptée par BALATRE (8), afin d'obtenir une réaction présentant un maximum d'intensité se traduisant par un plateau.

La réaction xanthoprotéique a permis à M. MACHEBOEUF et ses collaborateurs, de proposer un micro-dosage très simple des protides dans le sérum (71) (72) et le liquide céphalo-rachidien (73).

La réaction de l'arginine a été étudiée par ANTHONY, ALBANESE et leurs collaborateurs (4).

La tyrosine se prête mal au dosage des protides totaux, les résultats étant notablement différents pour la sérum-albumine et la sérum-globuline. ANDERSCH et GIBSON ont expérimenté cette technique (3).

Citons encore une micro-méthode proposée par GOIFFON et BEAUCERF, (44 - 45) qui consiste à précipiter les protides par un excès de réactif phospho-tungsto-molybdique; cet excès est dosé par colorimétrie.

Signalons enfin une technique néphélométrique due à LOONEY (67). L'agent précipitant étant l'acide sulfo-salicylique.

#### b) Dosage de la sérum-albumine et de la sérum-globuline

Alors que dans le cas des protides totaux les résultats fournis par les différentes méthodes sont très voisins, les écarts sont souvent importants lorsque l'on dose les deux fractions sérum-albumine et sérum-globuline. Ces divergences sont dues au fait que l'on est pas en présence d'entités chimiques, mais de mélanges définis plutôt par le mode de frac-

tionnement utilisé. Actuellement, seules les méthodes physiques, ultracentrifugation et surtout électrophorèse semblent satisfaisantes malgré l'importance qu'attachent certains auteurs au fractionnement par les sels (99).

La séparation s'effectue toujours par insolubilisation de la sérum-globuline par les sels minéraux, les acides ou les solvants organiques; le plus souvent cette précipitation s'accompagne d'une dénaturation.

#### - Fractionnement par les sels minéraux

Les sels les plus utilisés sont le sulfate de magnésium, le sulfate de sodium, le sulfate d'ammonium, le sulfite de sodium, Actuellement, c'est la méthode au sulfate d'ammonium qui semble être adoptée par la grande majorité.

Le sulfate de magnésium à saturation signalé dès 1859 par DENIS (25) puis comparé au sulfate d'ammonium par PORGES et SPIROCK (94) a été adopté par KAYSER dans une méthode gravimétrique encore très employée (57); elle a l'inconvénient d'être longue et de nécessiter 10 cm<sup>3</sup> de sérum.

Le sulfate d'ammonium à demi-saturation précipite également la sérum-globuline, à saturation les protides totaux. Les résultats sont assez voisins de ceux obtenus par le sulfate de magnésium, si l'on a soin d'opérer avec une solution de sel à pH 7 (74).

DELSAL (23) a montré que c'est surtout vers les pH alcalins que la différence est sensible. Pratiquement il suffit de rester entre pH 5 et 7,5.

MACHEBOEUF et WALLICH (74) utilisent une méthode gravimétrique dosant séparément les deux fractions, évitant ainsi d'évaluer l'une d'elles par différence avec les protides totaux.

BALATRE (8) effectue une séparation identique, en vue de doser colorimétriquement par la réaction du biuret, protides totaux d'une part et sérum-albumine de l'autre; le volume de sérum est de 1,5 cm<sup>3</sup> environ. LOONEY (67) évalue néphélométriquement la sérum-globuline précipitée, et calcule le taux de sérum-albumine par différence avec les protides totaux; le volume de sérum nécessaire est de 2 cm<sup>3</sup>

Une étude de BAUDOUIN, LEWIN et HILLION (11) sur la précipitation par le sulfate d'ammonium a montré récemment que la séparation des deux fractions s'effectuait aussi bien sur des solutions de protides très diluées.

Le sulfate de sodium a été préconisé par HOWE et adopté par lui

non seulement pour doser séparément la sérum-albumine et la sérum-globuline (54) mais encore pour fractionner différentes globulines. Il a publié ensuite une semi-micro-méthode utilisant 0,5 cm<sup>3</sup> de sérum (55).

La séparation est effectuée par ce sel à demi-saturation à 37° pendant trois heures. Il évalue les différentes fractions en dosant l'azote résiduel, après précipitation de la sérum-globuline, puis de la sérum-albumine. La méthode est donc très longue puisqu'elle nécessite trois dosages d'azote.

KINGSLEY ( 61 ) a adopté le même mode de séparation, mais effectue le dosage par la réaction du biuret. ANTHONY et ALBANESE (4) terminent par le dosage de l'arginine, après hydrolyse alcaline.

La critique de cette méthode de fractionnement a été faite par LEUTSCHER (66) qui a montré qu'il y avait entraînement d'une partie de la sérum-albumine au cours de la précipitation, en outre une fraction de la sérum-globuline reste en solution. Actuellement le sulfate de sodium n'est pratiquement plus utilisé.

En revanche, le sulfite de sodium, préconisé par CAMPBELL et HANNA (14) a été adopté par plusieurs auteurs américains, en particulier par KING (60). Ils utilisent une concentration de sulfite de sodium hydraté à 7 molécules d'eau de 42 grs pour 100 cm<sup>3</sup> de solution. La précipitation est rapide, en dix minutes, à la température ordinaire. Cette méthode se prête à un semi-micro-dosage par azotométrie; il nécessite environ un cm<sup>3</sup> de sérum.

#### - Fractionnement par les acides

Ce mode de séparation est basé sur l'insolubilisation de la sérum-globuline au voisinage de son point isoélectrique.

PIETTRE et VIALA, qui semblent avoir utilisé les premiers cette méthode, opèrent sur le sérum délipidé préalablement, par l'acétone à basse température.

La solution de protides est amenée à pH 5,5 par addition ménagée d'acide chlorhydrique normal. Il est nécessaire d'opérer lentement, car un excès d'acide amène une redissolution du précipité. Nous avons vérifié que l'acide nitrique conduit aux mêmes résultats. Pour remédier à cet inconvénient important, surtout pour les solutions très diluées, ils utilisèrent ensuite le gaz carbonique. La technique de dosage dans le sérum a ensuite été mise au point par ADNOT (2), et utilisée depuis par de nombreux auteurs en raison de sa commodité et de la faible quantité de sérum employé (2 cm<sup>3</sup>). Le dosage est terminé soit pondéralement, soit par azotométrie (24 - 100).

Tout récemment, GOIFFON (46) a montré que l'acide borique permettait une bonne séparation sans délipidation préalable.

#### - Fractionnement par les solvants

PILLEMER et HUTCHINSON (90) utilisent le fractionnement par des solutions d'alcool méthylique à basse température; on dénature ainsi la sérum-globuline qui précipite. Cette méthode est délicate et difficile à réaliser.

Il en est de même de la technique indiquée par MACREBOEUF (75). La dénaturation de la globuline est réalisée à pH 4,6 par l'alcool éthylique.

Citons enfin la méthode proposée par DELSAL (28) qui emploie le mélange méthylal-méthanol en proportion convenable, qui insolubilise la sérum-globuline en la dénaturant. Cette méthode a l'avantage d'être réalisable en quelques minutes, à la température du laboratoire; l'auteur a vérifié sa technique par rapport à la méthode au sulfate d'ammonium. Nos expériences ont confirmé ses résultats. Le dosage est effectué pondéralement, la sérum-albumine étant précipitée ensuite par le même solvant à plus forte concentration.

En résumé, les méthodes qui a priori semblent les plus sûres et les plus pratiques sont :

- la méthode au sulfate d'ammonium qui sert en quelque sorte de référence.
- la méthode au gaz carbonique.
- la méthode au méthylal-méthanol.

Nous les avons personnellement utilisés toutes les trois au cours de ce travail, d'abord pour les vérifier pondéralement les unes par rapport aux autres, puis pour essayer de réaliser une micro-technique néphélométrique.

#### B) - MISE AU POINT D'UNE MICRO-MÉTHODE PERSONNELLE

La mise au point d'une micro-méthode de dosage fractionné des protides du sérum par néphélométrie, pose d'abord deux problèmes :

1° - Choisir une méthode de séparation de la sérum-albumine et de la sérum-globuline, fournissant un fractionnement identique sur le

sérum pur et sur une dilution de celui-ci; en effet, il n'est pas pratique d'effectuer sans dilution préalable, un dosage sur une prise d'essai restreinte.

2° - Trouver un agent de précipitation qui donne un flocculum suffisamment fin, ne se sédimentant pas trop vite, avec lequel on puisse obtenir un maximum d'opacité se traduisant par un palier, au bout d'un temps relativement court.

Nous avons essayé successivement une série de techniques de fractionnement avec des succès divers :

- a) Technique au sulfate d'ammonium suivant MACHEBOEUF & WALLICH (74).
- b) Technique au gaz carbonique suivant ADNOT (2).
- c) Technique au méthylal-méthanol suivant DELSAL (23).

Le réactif flocculant adopté d'abord a été l'acide nitrique puis le mélange méthylal-méthanol.

Nous exposerons les résultats qui nous ont amené à essayer successivement ces différentes méthodes, avant d'adopter la séparation par le méthylal-méthanol, et la floculation successive de la sérum-globuline et de la sérum-albumine, par ce même réactif.

#### 1) Technique au sulfate d'ammonium

Cette méthode nous a semblé intéressante car elle permet de précipiter la sérum-globuline et de la redissoudre ensuite. On peut ainsi obtenir deux solutions distinctes, à partir desquelles il est facile de réaliser la floculation.

Pour chaque sérum, nous avons effectué le dosage pondéral des deux fractions protidiques et une séparation en vue du dosage néphélométrique.

#### - Dosage pondéral

Dans un tube à centrifuger conique, mesurer 5 cm<sup>3</sup> de sérum clair et 5 cm<sup>3</sup> d'une solution saturée de sulfate d'ammonium amenée à pH 7 en présence de bleu de bromothymol. Boucher au caoutchouc et mélanger soigneusement par retournement. Laisser en repos deux minutes et centrifuger pendant 15 minutes à vitesse maximum. Le liquide surnageant contenant la sérum-albumine doit être parfaitement clair. Enduire le bord extérieur d'un tube d'une légère couche de vaseline, et décantier le liquide dans un Erlenmeyer de 150 cm<sup>3</sup>. Redissoudre le précipité de globulines dans 5 cm<sup>3</sup> d'eau, puis faire une seconde précipitation par

un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium. Après mélange et repos de 2 minutes, centrifuger comme précédemment. Décanter la liqueur claire dans le même Erlenmeyer, puis laver délicatement le culot de sérum-globuline avec 4 cm<sup>3</sup> de solution de sulfate d'ammonium à demi-saturation. Dissoudre de nouveau la sérum-globuline dans 5 cm<sup>3</sup> d'eau, et decanter la solution dans un second Erlenmeyer, puis rincer le tube avec 5 cm<sup>3</sup> d'eau employés en plusieurs fois. On a ainsi deux solutions contenant les deux fractions protidiques. Précipiter alors les albumines par l'alcool à 95° en utilisant :

90 cm<sup>3</sup> pour la solution de sérum-albumine  
et 60 cm<sup>3</sup> pour la sérum-globuline.

Réaliser ensuite la dénaturation des protéines par chauffage, au B.M. bouillant pendant 15 minutes, après avoir obturé les fioles au coton cardé. Les deux précipités sont versés respectivement sur des doubles filtres équilibrés, lavés en filtrant sous vide, à l'eau bouillante jusqu'à élimination des sulfates, à l'éther pour éliminer les lipides, puis séchés à l'étuve à 80° jusqu'à poids constant. Ramener les taux trouvés à un litre en multipliant par 200.

Cette technique longue mais simple, est parfois rendue difficile par suite de la difficulté que l'on rencontre, lorsque les sérums sont riches en lipides, pour obtenir une solution claire par centrifugation. Dans certains cas, il nous a fallu même renoncer à cette méthode.

#### - Conditions du dosage néphélométrique

La séparation est effectuée comme précédemment, mais les solutions de sérum-albumine et de sérum-globuline sont amenés à l'aide de sérum-physiologique à un volume de 100 cm<sup>3</sup>.

On a ainsi dans 100 cm<sup>3</sup> la sérum-albumine de 5 cm<sup>3</sup> de sérum et dans 100 autres la sérum-globuline de la même prise d'essai. Ces solutions sont trop concentrées pour servir aux mesures néphélométriques. Lors des premiers essais, entrepris avec l'Analyscomètre JOUAN, en transmission, une dilution 1/3 était généralement utilisée. Avec l'appareil de DOGNON, plus sensible, il est nécessaire de diluer à 1/5 environ; les limites supérieures de concentrations utilisables étant pour la sérum-albumine de 40 mg % et pour la sérum-globuline de 70 mg %. La précipitation est réalisée par l'acide nitrique pur, dont nous utilisons à l'origine 4 cm<sup>3</sup> pour 20 cm<sup>3</sup> de solution.

La mesure de la diffusion a été effectuée dans les conditions suivantes : en lumière blanche, en cuve de 20 mm, la sensibilité étant de 100 divisions du microampéremètre pour 5 % de lumière diffusée (à 90° par rapport au flux incident). Elles seront identiques pour les autres méthodes. Les essais, entrepris en lumière rouge, n'ont apporté aucune

différence dans les résultats, les grains étant relativement gros. C'est pour une raison de commodité que nous avons alors adopté la lumière blanche.

Nous avons d'abord effectué sur les deux fractions, une étude cinétique de la réaction. Le maximum est atteint entre 6 et 8 minutes pour la sérum-albumine, vers 10 minutes pour la sérum-globuline; ce maximum est le même dans toute l'échelle des concentrations qui nous intéressent. Nous faisons nos lectures au bout de 15 minutes, résultat en accord avec les valeurs indiquées par DANET et LAISNE (21) pour les protides totaux (vingt minutes).

Les premiers résultats obtenus nous permettent quelques remarques :

1° - Les précipités correspondant aux deux fractions sont d'aspects assez différents, celui de sérum-albumine, incolore, très fin, se sédimente très lentement; il est encore homogène au bout de trente minutes; celui de sérum-globuline nettement plus floconneux, légèrement coloré en jaune, se sédimente plus rapidement; il est encore homogène au bout de quinze minutes. Il est à noter que dans tous les cas, les précipités, remis en suspension par agitation, même après douze heures de contact, fournissent les mêmes résultats qu'après quinze minutes.

2° - Les courbes d'étalonnage, dans les limites indiquées précédemment, sont des droites. Toutefois, pour les très faibles concentrations, entre 0 et 3 mg %, une légère action dissolvante de l'acide sur le précipité se manifeste.

3° - Les quantités de sérum-albumine et de sérum-globuline nécessaires pour obtenir une même diffusion sont très différentes, il faut environ deux fois plus de sérum-globuline.

Ceci exclut donc la possibilité d'effectuer la néphélémétrie des protides totaux.

Il est à noter que cette particularité ne se manifeste pas pour tous les agents précipitants, l'acide trichloracétique par exemple, ce qui laisse toute sa valeur à la méthode de MESTREZAT pour le liquide céphalo-rachidien.

L'étalonnage a été effectué successivement sur différents sérums; il a fait apparaître une difficulté énorme, déjà signalée. Les fractions isolées à partir de sérums divers fournissent, à concentrations égales, des valeurs différentes (en transmission et en diffusion). De ce fait, les courbes d'étalonnage obtenues pour plusieurs sérums ne coïncident pas; les résultats de trois sérums portés sur le graphique en témoignent. La différence attribuée par les auteurs aux lipides, est

surtout importante pour la sérum-globuline; nous avons vérifié que la taille des particules n'intervenait pas. Certains sérums anormaux ont fourni des résultats inférieurs de 50 % aux valeurs habituelles.

#### Sérum-albumine

|         |      |       |    |                    |
|---------|------|-------|----|--------------------|
| Sérum 5 | 50   | gr. % | .. | courbe portée en . |
| Sérum 6 | 35,5 | gr. % | .. | " " " o            |
| Sérum 7 | 44,9 | gr. % | .. | " " " +            |
| Sérum 8 | 42   | gr. % | .. | " " " □            |

#### Sérum-globuline

|          |      |       |    |                    |
|----------|------|-------|----|--------------------|
| Sérum 6  | 43   | gr. % | .. | courbe portée en . |
| Sérum 7  | 27   | gr. % | .. | " " " o            |
| Sérum 14 | 18,9 | gr. % | .. | " " " +            |

Les concentrations portées sur les courbes sont exprimées en mg % cm<sup>3</sup> de solution, avant l'addition de l'acide (courbes 19 et 20).

Il nous est apparu ensuite, qu'une concentration plus faible en acide nitrique était suffisante, et qu'on pouvait en utiliser 2 cm<sup>3</sup> pour 20 cm<sup>3</sup> ou de préférence 10 cm<sup>3</sup> d'acide dilué à 1/5 pour 10 cm<sup>3</sup> de solution. Les différences entre les courbes d'étalonnage persistant, il fallut recourir à une autre méthode de fractionnement, permettant en outre l'élimination des lipides. Nous avons essayé alors la technique d'ADNOT à l'anhydride carbonique.

#### 2) Technique au gaz carbonique

Après délipidation du sérum par l'acétone, la sérum-globuline est précipitée à son point isoélectrique par le gaz carbonique, qui abaisse le pH de la solution vers 5,5.

En règle générale, les résultats fournis par la méthode d'ADNOT et par celle de MACHEBOEUF & WALLICH sont assez voisins; la teneur en protides totaux est un peu plus faible avec cette dernière, le rapport des deux fractions étant peu affecté.

Nous avons repris nos essais et procédé à l'étalonnage de notre appareil par rapport à plusieurs sérums dans lesquels on effectuait des dosages pondéraux. Dans l'un et l'autre cas, nous avons opéré sur 1 cm<sup>3</sup> de sérum.

#### - Dosage pondéral

Un cm<sup>3</sup> de sérum est mesuré dans un tube à centrifuger conique et additionné de 1 cm<sup>3</sup> d'eau bi-distillée, refroidie vers 1°, puis de

10 cm<sup>3</sup> d'acétone refroidi vers -5°. Le mélange est homogénéisé, puis centrifugé rapidement pendant trente secondes à 3.600 tours/minutes. La solution surnageante est décantée, le culot de protides totaux redissout dans 2 cm<sup>3</sup> d'eau bi-distillée froide; on procède ensuite à deux nouvelles précipitations par 14 cm<sup>3</sup> d'acétone en présence d'une goutte de solution de chlorure de sodium à 1 p.100. Après une dernière décantation, le précipité est entraîné sur un filtre taré, lavé à l'acétone, séché à 80° et pesé. On calcule ensuite la teneur en protides totaux. Un traitement identique est effectué sur un autre cm<sup>3</sup>, mais après les trois délipidations, le précipité est redissout dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau bi-distillée froide. On insolubilise alors la sérum-globuline par un courant de gaz carbonique, pendant six minutes, en présence d'une goutte d'alcool octylique destiné à éviter la mousse. La solution est centrifugée, le culot de sérum-globuline égoutté soigneusement, lavé avec un peu d'eau saturée de gaz carbonique, puis entraîné par de l'acétone sur des filtres équilibrés. On sèche et pèse. On calcule ensuite la teneur en sérum-globuline en gr. p. 1000 et évalue la sérum-albumine par différence.

#### - Conditions du dosage néphélométrique

La séparation s'effectue dans les mêmes conditions; la solution de sérum-albumine est décantée dans un ballon jaugé de 100 cm<sup>3</sup>, que l'on remplit jusqu'au trait de jauge avec q.s. de sérum physiologique. Le culot de sérum-globuline est pratiquement insoluble dans l'eau, et même dans les solutions à 10 p.100 de chlorure de sodium. Elles donnent des suspensions opaques, que l'on peut clarifier par addition de 1 ou II gouttes d'ammoniaque. On complète également à 100 cm<sup>3</sup> avec du sérum physiologique.

La solution de sérum-albumine est en général, diluée à 2,5 fois son volume primitif, celle du sérum-globuline, utilisée telle quelle pour la construction de la courbe. On constate que :

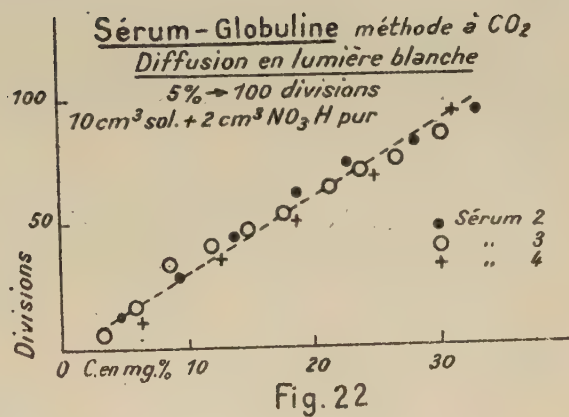
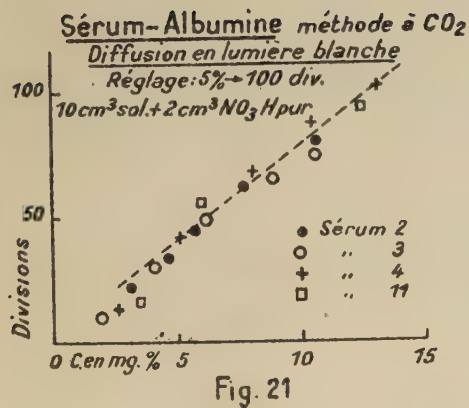
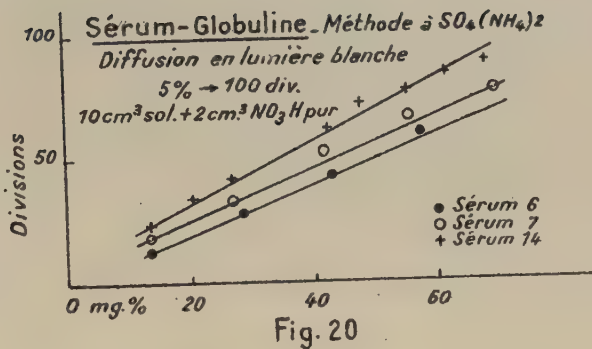
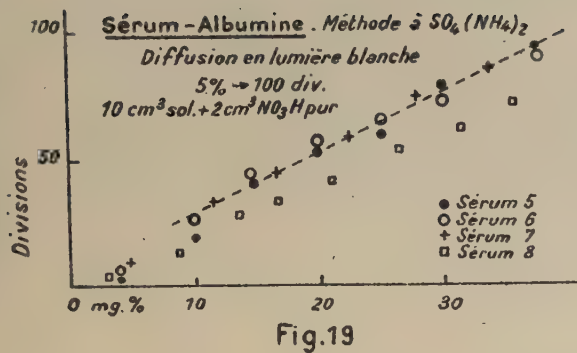
1° - Les écarts trouvés avec la technique précédente, pour différents sérums, ont disparu.

2° - Pour des concentrations égales, chaque fraction donne une plus grande opacité (et une plus grande diffusion) quand elle est délipidée; ce fait avait d'ailleurs été déjà signalé.

Les courbes 21 et 22 correspondent à l'utilisation de 4 cm<sup>3</sup> d'aci de pour 20 cm<sup>3</sup> de solution. (Le résultat est absolument identique quand on emploie 20 cm<sup>3</sup> à 1/5).

#### Sérum albumine

|          |      |         |        |        |      |             |
|----------|------|---------|--------|--------|------|-------------|
| Sérum 2  | 37,6 | gr.o/oo | courbe | portée | en . |             |
| Sérum 3  | 52   | " "     | " "    | " "    | " "  | o           |
| Sérum 4  | 65   | " "     | " "    | " "    | " "  | +           |
| Sérum 11 | 50,6 | " "     | " "    | " "    | " "  | □ (fig. 21) |



### Sérum globuline

Sérum 2 . 47,5 gr. %.. courbe portée en  
 Sérum 3 o 30 " %.. " " "  
 Sérum 4 + 30,9 " %.. " " " (fig. 22)

Des essais entrepris avec de nombreux sérums d'enfants atteints d'affections rénales, néphrites, néphroses lipoïdiques, ont fourni par lecture nephélométrique, par rapport aux courbes précédentes, des résultats très satisfaisants.

### Néphrose lipoïdique n° 23 :

#### Sérum albumine

Dosage pondéral..... 13 gr. par litre  
 Dosage nephélométrique..... 13,80 "

#### Sérum globuline

Dosage pondéral..... 28 gr. par litre  
 Dosage nephélométrique..... 27,10 "

La teneur en lipides totaux était de 25 gr. par litre

Cependant, quelques anomalies déjà constatées, quelques années auparavant, dans la précipitation par le gaz carbonique, se sont reproduites assez fréquemment. Sur deux cents dosages environ, cinq ou six cas, tout à fait anormaux, ont été constatés. La précipitation par CO<sub>2</sub> est tantôt très faible, tantôt seulement incomplète. Durant notre internat, ayant constaté cette anomalie, nous en avons recherché l'explication.

La technique d'ADNOT et celle de MACHEBOEUF & WALLICH effectuées parallèlement donnaient les résultats suivants en gr. pour mille :

|                 | ADNOT | MACHEBOEUF |
|-----------------|-------|------------|
| Protides totaux | 63    | 62,7       |
| Sérum albumine  | 45,5  | 28,6       |
| Sérum globuline | 17,5  | 34,1       |

Un dosage au sulfate de magnésium confirmait le résultat de la méthode au sulfate d'ammonium. Ayant vérifié le pH au cours de la précipitation de la sérum-globuline, nous avons constaté que celui-ci ne s'abaissait pas vers 5,5, mais restait toujours supérieur à 6; le rouge de méthyle ajouté à la solution ne virait pas au rose, mais restait

jaune. Pensant avec ARCAND qu'il s'agissait peut-être d'un effet tampon dû à des sels minéraux incomplètement éliminés par la précipitation acétonique, nous avons déterminé sur un sérum normal, la quantité de solution de carbonate de sodium nécessaire pour éviter la précipitation.

Cinq cm<sup>3</sup> de solution contenant 30 mg environ de protides totaux fournissent une précipitation totale en présence de 0,5 cm<sup>3</sup> de solution de carbonate de sodium à 1 pour mille et une précipitation presque nulle pour une solution à 1 pour cent. Dans ce cas le rouge de méthyle ne vire pas. La présence d'une telle quantité de sel ne pouvant pas être envisagée, il semble plus probable que l'effet tampon soit dû à la protéine elle-même. En effet, si l'on substitue au gaz carbonique, une solution diluée d'un acide fort suivant PIETTRE, on obtient une précipitation totale quand l'indicateur a viré.

En dehors de cette anomalie explicable par un effet tampon, nous en avons constaté une autre, plus curieuse encore. Au cours de la précipitation par CO<sup>2</sup> en présence de rouge de méthyle, un précipité abondant apparaît rapidement avec virage de l'indicateur; puis, en continuant à faire passer le gaz, on voit la solution s'éclaircir nettement, une centrifugation effectuée à ce moment, fournit un résultat pondéral trop faible. La suspension laissée pendant une nuit à la glacière présente le lendemain un précipité abondant et le résultat est normal. Un nouveau courant de CO<sup>2</sup> amène encore la redissolution d'une partie du précipité.

Il nous a été signalé par ailleurs un cas assez semblable, celui d'une solution qui restait absolument limpide après passage à CO<sup>2</sup> et qui ne précipitait qu'après séjour d'une nuit à la glacière.

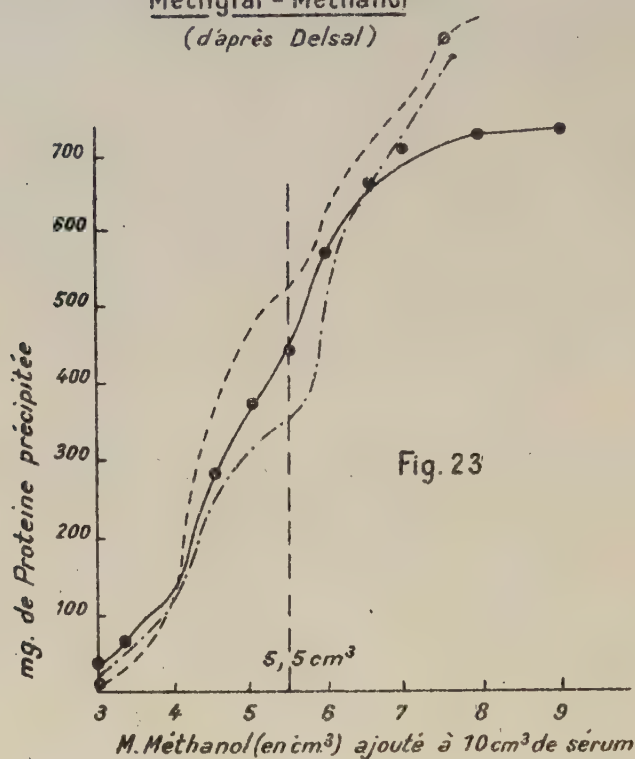
Malgré les résultats favorables obtenus par cette méthode, même en opérant sur 1 cm<sup>3</sup> de solution de sérum dilué à 1/10 dans le sérum physiologique, c'est-à-dire sur un prélèvement de 0,1 cm<sup>3</sup>, nous avons renoncé à l'utiliser.

Néanmoins, un point restait acquis; il était possible de faire un dosage néphélométrique de la sérum-albumine et de la sérum-globuline, à condition de délipider, et de trouver une méthode de fractionnement satisfaisante.

### 3) Technique au méthylal-méthanol

DELSAL constata qu'en ajoutant, à un même volume de sérum, 10 cm<sup>3</sup> par exemple, des quantités de plus en plus grandes de mélange méthylal-méthanol, (4 volumes de méthylal pour 1 volume de méthanol) on obtenait des précipités de plus en plus abondants. En portant sur un graphique la quantité de protides précipités en fonction du volume de réactif utilisé, il constata sur ses courbes un point singulier pour 5,5 cm<sup>3</sup>. Ce point correspondant à la précipitation de la sérum-globuline (courbe 23).

Précipitation fractionnée par le  
Méthylal - Méthanol  
(d'après Delsal)



Nous avons comparé, à notre tour, les résultats obtenus par la méthode au sulfate d'ammonium et celle de DELSAL au méthylal-méthanol. Nous avons confirmé les résultats de cet auteur, bien que dans l'ensemble le parallélisme nous ait paru un peu moins rigoureux, ce qui ne saurait être surprenant.

Voici quelques chiffres (en gr. pour mille)

|                 | MACHEBOEUR | DELSAL |
|-----------------|------------|--------|
| <u>Sérum 11</u> |            |        |
| P.T.            | 79,1       | 80,1   |
| S.A.            | 50,6       | 49,9   |
| S.G.            | 28,5       | 30,2   |
| <u>Sérum 14</u> |            |        |
| P.T.            | 61,3       | 60,9   |
| S.A.            | 42,4       | 40,3   |
| S.G.            | 18,9       | 21,6   |

|                 |      | MACHEBOEUF | DELSAL |
|-----------------|------|------------|--------|
| <u>Sérum 15</u> | P.T. | 75,7       | 78,1   |
|                 | S.A. | 47,3       | 47,2   |
|                 | S.G. | 28,4       | 30,9   |
| <u>Sérum 24</u> | P.T. | 70,2       | 72,1   |
|                 | S.A. | 46,0       | 43,3   |
|                 | S.G. | 24,2       | 28,8   |
| <u>Sérum 31</u> | P.T. | 80,0       | 80,3   |
|                 | S.A. | 32,1       | 35,0   |
|                 | S.G. | 47,9       | 45,3   |
| <u>Sérum 32</u> | P.T. | 64,5       | 66,5   |
|                 | S.A. | 41,6       | 48,0   |
|                 | S.G. | 22,9       | 18,5   |
| <u>Sérum 34</u> | P.T. | 72,3       | 72,7   |
|                 | S.A. | 45,0       | 47,7   |
|                 | S.G. | 27,3       | 25,0   |

#### Dosage pondéral

Dans un tube à centrifuger conique, mesurer 5 cm<sup>3</sup> de sérum, et précipiter la sérum-globuline par 2,75 cm<sup>3</sup> de méthylal-méthanol. Laisser 30 minutes en contact, et centrifuger 10 minutes à grande vitesse. Décanter la solution dans un second tube à centrifuger. Laver le culot de sérum-globuline à 3 reprises avec quelques cm<sup>3</sup> de méthylal-méthanol, puis à l'éther anhydre (pour ôter le reste des lipides). Faire passer le précipité sur un filtre taré, sécher à 100° pendant deux heures et peser. La solution de sérum-albumine est précipitée par 10 cm<sup>3</sup> de méthylal-méthanol, centrifugée aussitôt et le culot traité comme le précédent. Rapporter les résultats à un litre de sérum.

### Conditions du dosage néphélométrique

Une difficulté est apparue immédiatement : il est impossible de redissoudre la sérum-globuline après sa précipitation. Il est donc nécessaire d'évaluer directement la sérum-globuline sur une dilution de sérum, traitée par le méthylal-méthanol dans les proportions indiquées par DELSAL. Il fallait en outre savoir si le point singulier trouvé par cet auteur à 5,5 cm<sup>3</sup> de réactif pour 10 cm<sup>3</sup> de sérum, était bien situé au même endroit dans le cas du sérum dilué. Nous avons évalué l'intensité de la lumière diffusée par ces solutions, auxquelles on ajoutait des quantités croissantes de réactif, tout en maintenant constante la concentration finale de la solution pour rester dans les mêmes conditions de dilution. Le point singulier est moins net que pour le sérum pur, mais se situe bien entre 5 et 5,5 cm<sup>3</sup> de réactif.

### Etalonnage pour le dosage de la sérum-globuline

La dilution convenable pour un sérum normal étant d'environ 1/200, nous avons effectué sur sept sérums la construction d'une courbe auxquels on pourrait rapporter les valeurs trouvées pour d'autres échantillons. La dilution mère utilisée était de 1/100; pour chaque courbe nous avons fait 8 points environ pour des concentrations comprises entre 0 et 30 mg. p. cent. Un témoin à blanc permet de retrancher des valeurs trouvées la diffusion propre à la solution. Il est constitué par le mélange suivant :

|                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| Sérum physiologique | 10 cm <sup>3</sup>  |
| Méthylal-méthanol   | 5,5 cm <sup>3</sup> |

Pour divers sérums, cette courbe unique est une droite, entre 5 et 30 mg. p. cent (courbe 24). Les lectures sont faites également au bout de 20 minutes.

### Etalonnage pour le dosage de la sérum-albumine

Il paraissait a priori plus facile. Nous avons d'abord précipité la sérum-globuline contenue dans 5 cm<sup>3</sup> de sérum, par le méthylal-méthanol, précipité la sérum-albumine par ce même réactif, et redissout le culot dans 10 cm<sup>3</sup> de sérum physiologique. A l'aide de cette solution, diluée à 1/10, nous avons préparé une gamme contenant des quantités de sérum-albumine comprises entre 0 et 20 mg. p. cent à laquelle nous avons ajouté un volume égal d'acide nitrique à 20 p. cent. La courbe obtenue (courbe 25) est une droite presque superposable à celle fournie par la méthode d'ADNOT dans les mêmes conditions.

Il nous est apparu en outre, que la précipitation de la sérum-albumine n'est pas indispensable. On peut utiliser directement la li-  
queur surnageant au-dessus du culot de sérum-globuline, simplement en la diluant au préalable.

Dès lors, il paraissait possible d'envisager une micro-méthode permettant d'opérer sur 0,1 cm<sup>3</sup> de sérum après dilution à 20 cm<sup>3</sup>; on pourrait précipiter d'abord la sérum-globuline, par le méthylal-méthanol, puis après centrifugation, la sérum-albumine par l'acide nitrique à 1/5. Toutefois, il convenait de remarquer, que l'application de cette micro-méthode ferait ajouter l'acide nitrique à une solution riche en méthylal-méthanol.

Il était donc utile de vérifier le pouvoir flocculant de NO<sup>3</sup>H en présence de ce solvant; nous avons constaté que dans ces conditions la précipitation était incomplète.

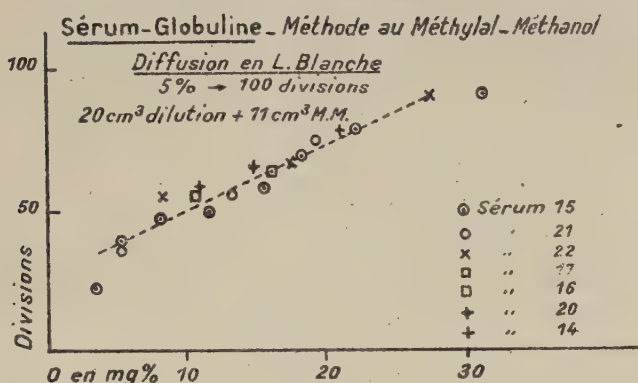


Fig. 24

|    | Sol. de<br>Sérum-albumine | Cl Na 8 o/oo         | Méthylal-<br>Méthanol | NO <sup>3</sup> H<br>1/5 | Diffusion |
|----|---------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------|
| I  | 2 cm <sup>3</sup>         | 13,5 cm <sup>3</sup> | 0                     | 15,5 cm <sup>3</sup>     | 90        |
| II | 2 cm <sup>3</sup>         | 8, cm <sup>3</sup>   | 5,5 cm <sup>3</sup>   | 15,5 cm <sup>3</sup>     | 65        |

Il fallait donc renoncer à employer la précipitation par NO<sup>3</sup>H et envisager l'utilisation du mélange méthylal-méthanol pour la précipitation de la sérum-albumine.

Si l'on utilise un volume de réactif égal à celui de la solution privée de sérum-globuline pour précipiter la sérum albumine, la concentration finale en méthylal-méthanol est alors la suivante :

Pour 10 cm<sup>3</sup> de dilution de sérum, on ajoute 5,5 cm<sup>3</sup> de réactif plus 15,5 cm<sup>3</sup> de nouveau, soit,

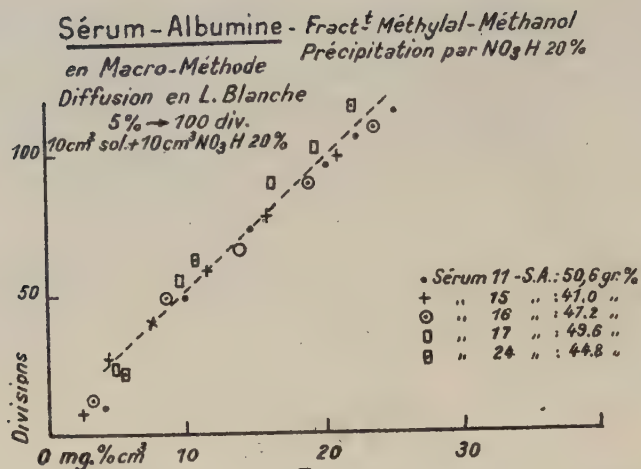


Fig. 25

pour 10 cm<sup>3</sup> de dilution 21 cm<sup>3</sup> de réactif.

C'est donc dans ces conditions que nous avons construit notre gamme d'étalonnage pour la sérum-albumine.

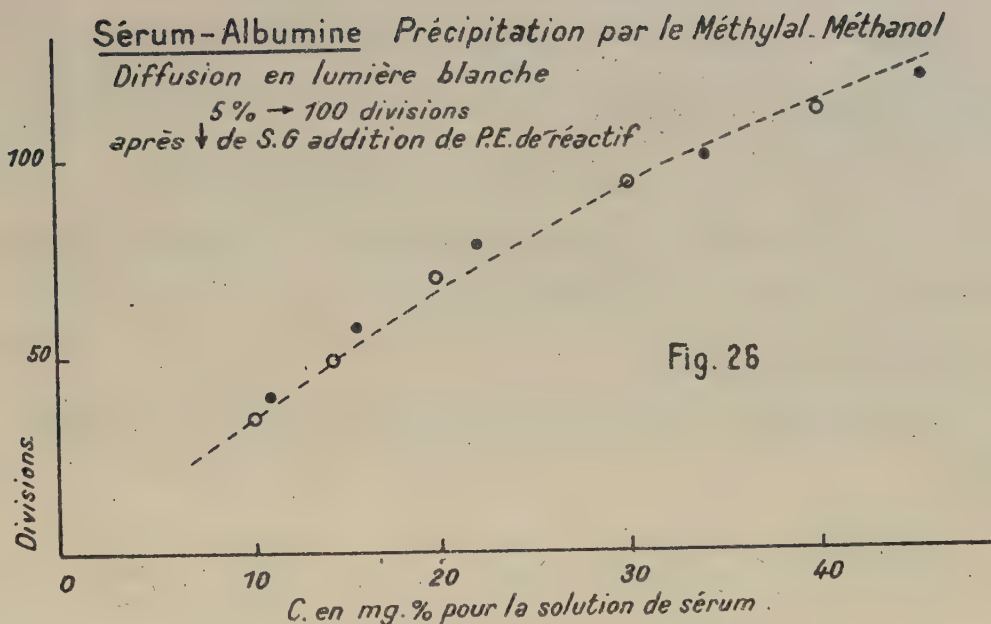
La sérum-albumine de 5 cm<sup>3</sup> de sérum contenu dans 100 cm<sup>3</sup> de sérum physiologique est diluée à 1/5.

On prépare ensuite une gamme :

| Tube | Sol. de<br>Sérum-Albumine | Cl Na 8 o/oo      | Réactif            |
|------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| I    | 10 cm <sup>3</sup>        | 0 cm <sup>3</sup> | 21 cm <sup>3</sup> |
| II   | 7,5                       | 2,5               | 21                 |
| III  | 5                         | 5                 | 21                 |
| IV   | 3,5                       | 6,5               | 21                 |
| V    | 2,5                       | 7,5               | 21                 |
| VI   | 0                         | 10                | 21                 |

On note les diffusions au bout de 15 minutes, retranche la valeur trouvée pour le tube VI (témoin) et construit la courbe d'étalonnage (courbe 26). Si l'on compare la courbe ainsi obtenue avec celle que fournit la floculation par  $\text{NO}_3\text{H}$  à 1/5, on constate qu'elles sont presque identiques (si l'on considère les concentrations finales).

Les courbes fournies par la sérum-albumine provenant de différents sérums étant superposables, nous avons adopté la technique suivante :



#### Technique adoptée

Prélever à l'aide d'une micro-pipette  $0,1\text{cm}^3$  de sérum non hémolysé, et le diluer dans  $20\text{cm}^3$  de cette solution correspondant à  $0,05\text{cm}^3$  de sérum, ajouter  $5,5\text{cm}^3$  d'un mélange méthylal-méthanol (4 parties de méthylal pour 1 partie de méthanol). Mélanger avec soin et laisser en repos pendant 20 minutes. Remplir la cuve de 20 mm. et effectuer la lecture à l'aide du diffusio-absorptiomètre de DOGNON en diffusion. On opérera en lumière blanche; la sensibilité sera choisie en faisant correspondre 5 p. cent de lumière diffusée à 100 divisions du micro-ampèremètre (On pourra accroître la sensibilité en prenant 150 divisions au lieu de 100 si l'on dispose de cellules très sensibles). On aura soin de veiller à ce que la solution soit bien homogène et sans bulles gazeuses. Pour cela, vérifier que deux mesures successives donnent bien le même résultat. Retrancher du chiffre lu la diffusion d'un témoin constitué par  $10\text{cm}^3$  de sérum physiologique et  $5,5\text{cm}^3$  de réactif. Se reporter à la courbe d'étalonnage pour calculer la teneur en sérum-globuline.

La suspension de sérum-globuline est immédiatement centrifugée pendant cinq minutes à grande vitesse. La solution obtenue doit être limpide. En mesurer  $5\text{cm}^3$  dans un tube à essai, et ajouter  $5\text{cm}^3$  de réactif. Agiter et mesurer la diffusion au bout de 15 minutes par rapport à un témoin constitué par  $5\text{cm}^3$  de sérum physiologique et  $10,5\text{cm}^3$  de réactif. Se reporter à la courbe d'étalonnage pour évaluer la teneur en sérum-albumine.

## C A L C U L

### - Pour la Sérum-globuline

La courbe 25 donne  $x$  la teneur en mg p. cent.

Soit  $\frac{x}{5}$  dans  $0,1 \text{ cm}^3$  et  $x \times 2$  mg par  $\text{cm}^3$ , soit dans 1 litre, en exprimant le résultat en gramme :  $x \times 2$ .

### - Pour la Sérum-albumine

Se rapporter à la courbe 27 et effectuer le même calcul.

## RESULTATS

Nous avons effectué le plus souvent possible le contrôle de notre méthode par la méthode pondérale de DELSAL. Dans nos conditions expérimentales la précision de la méthode est de l'ordre de 2 à 4 p. cent.

Voici quelques résultats obtenus :

| <u>Sérums</u> | <u>Macro-méthode</u> |      | <u>Micro-méthode</u> |      |
|---------------|----------------------|------|----------------------|------|
|               | S.A.                 | S.G. | S.A.                 | S.G. |
| 35            | 35,1                 | 42,4 | 34                   | 44   |
| 42            | 39,3                 | 21,6 | 38,7                 | 21,2 |
| 45            | 47,2                 | 32   | 48                   | 34   |
| 48            | 22                   | 31   | 22,5                 | 31   |
| 50            | 44,8                 | 25   | 42,5                 | 28   |
| 51            | 43,9                 | 52,8 | 43,5                 | 53   |
| 52            | 13                   | 28,3 | 13,6                 | 29,1 |

Les sérums 48 et 52 correspondent à des cas de néphroses lipidiques; les taux de lipides sont respectivement de 17 et de 24 gr p. mille.

### Remarques

1° - La méthode peut aisément être appliquée à un prélèvement plus restreint, un volume de  $25 \text{ mm}^3$  peut être suffisant; la lecture dans la cuve de 20 mm. ne nécessite en effet que  $5 \text{ cm}^3$  de liquide.

2° - Il est indispensable d'utiliser ses produits purs, en particulier en ce qui concerne le méthanol et le méthylal. Il y aura intérêt à rectifier ces deux solvants et à mesurer les volumes respectifs avec beaucoup de soin.

### C. - CHOIX D'UNE METHODE DE DOSAGE DES PROTIDES TOTAUX

Nous avons également envisagé l'utilisation d'une méthode simple permettant de doser les protides totaux.

Nos essais personnels ont porté sur la méthode réfractométrique, la micro-méthode colorimétrique de MACHEBOEUF, LACAILLE et REBEYROTTE, basée sur la réaction xanthoprotéique.

La réfractométrie nous a donné des résultats semblables à ceux trouvés par d'autres auteurs, de TRAVERSE et DEPRATIERE par exemple (104).

Voici quelques résultats par rapport au dosage pondéral suivant MACHEBOEUF ou DELSAL (sur 5 cm<sup>3</sup>). Nous nous sommes reportés aux tables de REISS (97). Les déterminations ont été faites à 17°5 à l'aide du réfractomètre d'ABBE qui fournit 3 décimales exactes et permet d'apprécier la 4<sup>ème</sup>.

| <u>Sérum</u> | <u>Dosage pondéral</u> | <u>Indice</u> | <u>Taux calculé</u> |
|--------------|------------------------|---------------|---------------------|
| 15           | 77,8 gr o/oo           | 1,3515        | 90,3                |
| 16           | 79,2                   | 1,3510        | 87,5                |
| 17           | 71,0                   | 1,3500        | 81,0                |
| 18           | 54,0                   | 1,3499        | 81,0                |
| 19           | 52,5                   | 1,3469        | 63,5                |
| 20           | 77,5                   | 1,3495        | 78,7                |
| 21           | 68,4                   | 1,3495        | 78,7                |
| 22           | 61,3                   | 1,3470        | 64,3                |
| 22(plasma)   | 62,7                   | 1,3472        | 65,5                |
| 25           | 71,8                   | 1,3499        | 81,0                |
| 28           | 96,7                   | 1,3541        | 107,1               |
| 30           | 67,1                   | 1,3485        | 73,1                |
| 40           | 75,3                   | 1,3492        | 77,3                |

Le sérum 18 qui correspond à l'écart le plus grand provenait d'un malade atteint d'une néphrose lipoprotéique en voie de guérison; lipides totaux : 7 gr p. mille, Cholestérol total : 4,4 gr p. mille, Cholestérol libre : 3,1 gr p. mille.

Les écarts trop importants constatés, nous ont fait renoncer à cette méthode.

La micro-méthode de MACHEBOEUF et de ses collaborateurs nous a toujours fourni des résultats excellents, avec une précision de 1 gr. environ sur une prise d'essai de 0,01/cm<sup>3</sup> de sérum.

Nous avons adapté très légèrement leur technique pour employer notre électrophotomètre.

### Principe

Ce dosage doit être effectué dans des conditions très rigoureuses, dont le respect permet d'obtenir des résultats corrects, même dans les cas où le rapport des fractions protidiques est modifié. Il consiste à traiter une solution très diluée de sérum par l'acide nitrique dilué au B.M., à ajouter de l'ammoniaque; on mesure l'intensité de la coloration jaune obtenue.

### Technique

Préparer une dilution de sang à 1/100, à l'aide d'un mélangeur de Potain par exemple. Dans deux tubes à essai, lavés à l'eau bi-distillée mesurer :

|                                  | <u>Tube I</u>     |  | <u>Tube II (témoin)</u> |
|----------------------------------|-------------------|--|-------------------------|
| Dilution                         | 1 cm <sup>3</sup> |  | 0 cm <sup>3</sup>       |
| S. Physiologique                 | 0                 |  | 1                       |
| NO <sub>3</sub> H à 22,5 p. cent | 2                 |  | 2                       |
| 3 (en volume)                    |                   |  |                         |

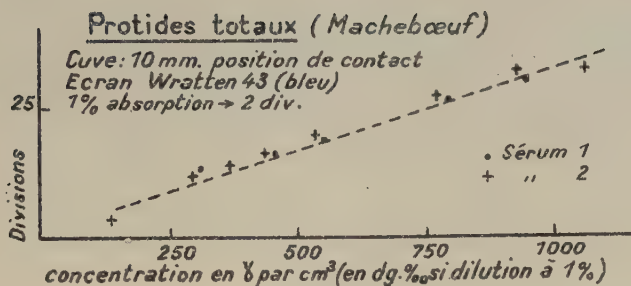
Porter au bain marie bouillant pendant 25 minutes exactement, en obturant presque totalement les tubes. Laisser refroidir pendant dix minutes, puis ajouter :

|                     | <u>Tube I</u>      |  | <u>Tube II (témoin)</u> |
|---------------------|--------------------|--|-------------------------|
| Solution concentrée |                    |  |                         |
| d'ammoniaque        | 1,5cm <sup>3</sup> |  | 1,5cm <sup>3</sup>      |

Laisser en contact 15 minutes puis centrifuger.

Nous avons fait les lectures au photomètre de DOGNON, en lumière bleue (écran WRATTEN 43), avec la cuve de 10 mm. placée au contact de la cellule et une sensibilité de 2 divisions pour 1 p. cent d'absorption.

On se reporte à une courbe d'étalonnage obtenue à l'aide de dilutions effectuées à partir d'une dilution mère à 1/50 d'un sérum



titré pondéralement. Nous avons obtenu une droite entre 0 et 1.200  $\gamma$  par  $\text{cm}^3$ . Pratiquement nous n'utilisons la courbe qu'en-dessous de 800  $\gamma$  comme l'indiquent les auteurs de la méthode bien que les résultats soient encore valables à 1.200. (fig. 27).

L'emploi systématique de cette réaction nous permet de faire quelques remarques.

Il est nécessaire de veiller à la limpidité des solutions, qui peut varier d'un tube à l'autre.

Il faut utiliser de l'ammoniaque concentrée; un flacon étant resté débouché pendant quelques semaines nous avait occasionné des erreurs par défaut atteignant 50 p. cent.

## 2° - MICRO-DOSAGE DU SODIUM DANS LE SÉRUM OU LE PLASMA

L'isolement du sodium en vue du dosage de cet élément se ramène toujours à la précipitation, soit du pyroantimoniate de sodium, soit d'un acétate triple d'uranyle de sodium et de magnésium, ou de zinc.

La première méthode, due à Kramer et Tisdall est basée sur l'évaluation pondérale du pyroantimoniate de sodium, elle est maintenant rarement utilisée malgré l'exactitude des résultats qu'elle fournit (63).

Les travaux de Streng (101) sont à l'origine des méthodes actuelles. Cet auteur, après avoir souligné la faible solubilité de l'acétate double d'uranyle et de sodium, puis de l'acétate triple d'uranyle

de magnésium et de sodium, n'avait utilisé ce dernier que dans un but qualitatif.

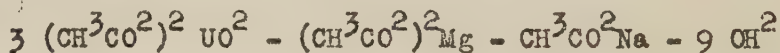
Blanchetière (10) devait mettre au point une méthode de dosage gravimétrique du sodium basée sur l'isolement de ce même sel. Toutes les méthodes actuelles en dérivent. Les unes continuent à utiliser le complexe précédent, les autres précipitent le sodium dans un autre dérivé très voisin, où le magnésium est remplacé par le zinc.

Nous rappellerons d'abord les différentes techniques basées sur l'isolement de chacun de ces deux complexes, et envisagerons ensuite plus spécialement les micro-méthodes.

Blanchetière précipitait initialement le sodium par un réactif préparé extemporanément à partir de deux solutions acétiques, d'acétate d'uranyle et d'acétate de magnésium. La durée de la précipitation était fixée à 30 minutes, le lavage effectué à l'alcool, la pesée du sel triple après séchage à 110°.

De nombreuses critiques furent faites à cette méthode, d'abord par Laudat (63) quant à la composition du réactif précipitant, et surtout par Kahane (56). Ce dernier montra que les résultats de Blanchetière étaient faussés par deux erreurs de sens contraire, la première par excès, due à l'inexactitude de la formule attribuée au complexe, la seconde par défaut, par suite d'une précipitation incomplète.

La formule proposée par Blanchetière :



s'est révélée inexacte, le nombre de molécules d'eau n'étant que de six.

D'autre part, la précipitation ne peut être totale en 30 minutes, elle ne l'est qu'après 24 heures de contact.

Kahane propose un réactif de bonne conservation et modifie les conditions opératoires. Il utilise une solution hydro-alcoolique et acétique d'acétate de magnésium et d'acétate d'uranyle; le complexe ne cristallise qu'avec 6 molécules d'eau et, en outre, la précipitation est complète en 30 minutes. Il fixe avec précision la quantité de réactif à utiliser en fonction de la teneur en sodium de la prise d'essai et de la dilution. Il précise enfin le rôle des ions gênants. La technique gravimétrique publiée par Mademoiselle Pacu (81) (40) est une adaptation de la méthode de Kahane à divers liquides biologiques; elle nécessite environ 2 cm<sup>3</sup> de sérum.

Mademoiselle Tissier et H. Bénard (103) mirent à profit la réaction colorée que donnent les sels d'uranyle avec le ferrocyanure de potassium, pour élaborer une micro-technique colorimétrique.

Ils précisent les teneurs limites entre lesquelles le dosage est valable, le rôle de l'acidité du milieu, celui de la concentration en ferrocyanure de potassium. Le dosage est pratiqué après lavage et dissolution du précipité en milieu faiblement acétique.

Récemment Herbain (53) a publié une méthode très simple consistant à évaluer le taux de sodium en dosant l'acétate d'uranyle en excès dans la liqueur surnageante. Cette technique, qu'il a expérimenté sur des solutions pures, est évidemment plus simple car elle permet d'éviter le lavage du précipité de sel triple.

Kolthoff mit à profit avec Barber (9) l'insolubilité de l'acétate triple d'uranyle de zinc et de sodium, pour proposer une méthode pondérale assez voisine de celle de Blanchetière. Ces auteurs précisent les conditions opératoires; 30 minutes de contact à la glacière, et soulignent l'influence des ions gênants. Ils préconisent l'élimination des phosphates par la mixture magnésienne à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien, plutôt que par l'acétate d'uranyle sous forme de phosphate insoluble. Le potassium apparaît peu gênant si sa concentration est faible (inférieure à 50 mg p. cent), il en est de même pour les acides organiques.

Leur technique fut adaptée à l'analyse biochimique par Butler et Tuthill (13). Noyons (79) et King (59) proposent de terminer le dosage par colorimétrie à l'aide de la réaction de Mademoiselle Tissier et Bénard et indiquent une micro-méthode voisine de celle de ces auteurs.

Enfin une technique moins sensible figure dans la notice analytique du photomètre américain Lumetron (60); elle consiste en une évaluation de la coloration jaune du sel triple en solution acétique.

#### Méthodes expérimentées

Nous avons pris pour référence la méthode pondérale proposée par Mademoiselle Pacu, pour le contrôle de la solution de chlorure de sodium servant à l'étalonnage du photomètre, et pour le dosage dans les différents sérums.

L'unanimité des auteurs ayant indiqué l'identité des résultats obtenus par dosage après défécation et par minéralisation du sérum, nous n'avons pas utilisé cette dernière. Il convient toutefois de tenir compte du volume occupé par le précipité protéique obtenu par défécation, et de réduire de 3 p. cent environ les résultats obtenus (Kahane).

Cette correction ne s'applique que pour une défécation à parties égales de sérum et de solution d'acide trichloracétique.

#### Micro-technique de King (59)

Après défécation trichloracétique, le sodium est précipité par

le réactif de Kolthoff; le sel triple est lavé, puis dissout dans l'acide acétique dilué; la teneur en sel d'uranyle est évaluée colorimétriquement par la réaction de Mademoiselle Tissier et H. Bénard.

La formule du réactif est la suivante :

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Acétate d'uranyle à 2 OH <sup>2</sup> | 20 grs.             |
| Acétate de zinc à 2 OH <sup>2</sup>   | 60 grs.             |
| Acide acétique cristallisable         | 60 cm <sup>3</sup>  |
| Eau distillée tiède                   | 320 cm <sup>3</sup> |

On le filtre après 24 heures et le conserve à l'obscurité et à la glacière. On doit le filtrer à nouveau avant chaque dosage.

Nous avons réduit à 0,2 cm<sup>3</sup> le volume de la prise d'essai indiquée par King; il n'y a pas intérêt, malgré la sensibilité de la réaction colorée, à faire un prélèvement plus faible car la précipitation du sel triple serait moins complète. Nous préférons opérer sur le plasma, beaucoup plus facile à prélever. Le sang est recueilli, après piqure au doigt, à l'oreille ou au talon, dans un tube à hémolyse où l'on aura évaporé une goutte de solution de liquoïde à 0,4 p. cent; cette quantité d'anticoagulant est convenable pour une prise d'essai comprise entre 0,5 et 1 cm<sup>3</sup>. La quantité d'ions sodium ainsi introduite n'est pas gênante.

Dans un tube à hémolyse, déféquer une prise d'essai de 0,2 cm<sup>3</sup> à l'aide de 0,6 cm<sup>3</sup> de solution d'acide trichloracétique à 7 p. cent. Homogénéiser et centrifuger après cinq minutes de contact.

Préparer dans deux tubes à hémolyse 1 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu, ajouter dans le premier 0,2 cm<sup>3</sup> de liquide de centrifugation et dans le second (témoin) 0,2 cm<sup>3</sup> d'eau bi-distillée. Ajouter ensuite dans les deux tubes 0,4 cm<sup>3</sup> de réactif de Kolthoff. Agiter légèrement pour mélanger et laisser en repos à la glacière pendant 24 heures. On peut contenir d'un délai de 2 heures; nous n'avons pas obtenu, dans ce cas, de différence sensible. Centrifuger à grande vitesse pendant dix minutes, puis décanter avec soin la liqueur surnageante; laisser égoutter le tube en position verticale sur un papier filtre pendant quelques minutes.

Mettre le précipité en suspension dans 5 cm<sup>3</sup> d'un liquide de lavage, constitué par de l'alcool absolu saturé de sel triple.

(Celui-ci est obtenu en mélangeant 40 cm<sup>3</sup> de réactif de Kolthoff avec 50 cm<sup>3</sup> d'alcool à 50° saturé de chlorure de sodium; on ajoute 100 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu et sépare le précipité après un séjour de 24 heures à la glacière. Il est recueilli et lavé à l'alcool absolu; on l'agite dans 500 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu pour obtenir la saturation).

Centrifuger à nouveau pendant 10 minutes et décantier avec beaucoup de soin pour éliminer la totalité du liquide de lavage.

Dissoudre les précipités dans 80 cm<sup>3</sup> d'une solution d'acide acétique à 0,5 p. cent. Dans 2 tubes, prélever 10 cm<sup>3</sup> de cette solution et y ajouter 0,5 cm<sup>3</sup> d'une solution de ferrocyanure de potassium à 10 p. cent. Laisser les tubes à l'obscurité et mesurer l'absorption dans un délai compris entre 5 et 15 minutes.

On se placera dans les conditions indiquées plus loin pour l'étalonnage.

### ETALONNAGE

Nous avons adopté les conditions opératoires suivantes :  
écran vert Wratten n° 64, cuve de 5 mm. placée au contact de la cellule, sensibilité de 1,5 division pour 1 p. cent d'absorption; cette épaisseur de cuve restreinte, cette sensibilité moyenne, nous évitent des dilutions trop importantes, la très grande sensibilité de la réaction étant ici un inconvénient plutôt qu'un avantage, puisqu'on est limité pour la prise d'essai par la solubilité non négligeable du sel triple.

La courbe d'étalonnage s'étend sur une gamme de concentration de 0 à 1 mg par cm<sup>3</sup> de solution à doser.

Nous préparons d'abord une solution mère à 7,63 gr. p. mille de chlorure de sodium, correspondant à trois grammes de sodium par litre, soit 3 mg par cm<sup>3</sup>. Cette solution est contrôlée par la méthode pondérale de Mademoiselle Pacu. Elle sert à préparer après dilution à 1/3 dans de l'eau bi-distillée la gamme suivante :

|      | <u>Sol. à 1 mg par cm<sup>3</sup></u> | <u>Eau</u> | <u>Concentration</u>     |
|------|---------------------------------------|------------|--------------------------|
| I    | 5                                     | 0          | 1 mg par cm <sup>3</sup> |
| II   | 4,5                                   | 0,5        | 0,9                      |
| III  | 4,0                                   | 1,0        | 0,8                      |
| IV   | 3,5                                   | 1,5        | 0,7                      |
| V    | 3,0                                   | 2,0        | 0,6                      |
| VI   | 2,5                                   | 2,5        | 0,5                      |
| VII  | 2,0                                   | 3,0        | 0,4                      |
| VIII | 1,5                                   | 3,5        | 0,3                      |
| IX   | 1,0                                   | 4,0        | 0,2                      |
| X    | 0,5                                   | 4,5        | 0,1                      |
| XI   | 0                                     | 5,0        | 0                        |

Pour chacun de ces tubes, on procède à la précipitation du sel triple comme il a été dit pour le dosage, en mesurant une série de onze

tubes à hémolyse :

|                  |                     |
|------------------|---------------------|
| Solution à doser | 0,2 cm <sup>3</sup> |
| Alcool absolu    | 1 cm <sup>3</sup>   |
| Réactif          | 0,4 cm <sup>3</sup> |

Les tubes sont bouchés au caoutchouc et portés à la glacière pendant 24 heures, les solutions décantées, les précipités lavés, égouttés comme précédemment, et dissous dans 40 cm<sup>3</sup> seulement de solution acétique à 0,5 p. cent. Dans ces conditions, le liquide de défécation d'un plasma, qui contient en moyenne 0,8 mg de sodium par/cm<sup>3</sup> correspondra au tube 7 et non au tube 3. Il se situera donc vers le milieu de la gamme.

La colorimétrie est effectuée comme précédemment; les résultats trouvés permettent de construire la courbe 28.

#### Remarques

Le dosage du sodium dans le sérum ou le plasma suivant la technique de King nous amène à faire quelques remarques :

1° - La précipitation et le lavage du précipité de sel triple doivent s'effectuer avec beaucoup de soin, dans du matériel très propre, pour éviter l'apport de sodium aussi bien que les pertes lors des décantations. Si le dosage est bien conduit, le chiffre trouvé pour le témoin doit être très faible, il est dû surtout à la coloration propre au ferrocyanure de potassium.

2° - Le liquide de lavage doit être filtré avant chaque dosage à la température à laquelle on doit opérer, pour éviter la dissolution ou la précipitation d'une quantité si faible soit-elle de sel triple.

3° - Il est plus pratique d'utiliser une solution de ferrocyanure de potassium à 10 p. cent comme nous le proposons plutôt qu'une solution deux fois plus concentrée comme l'indique King, on mesure ainsi un volume double avec beaucoup plus de commodité.

4° - Le délai de lecture de 15 minutes au maximum, doit être observé pour éviter l'apparition d'ondes moirées faussant la lecture colorimétrique.

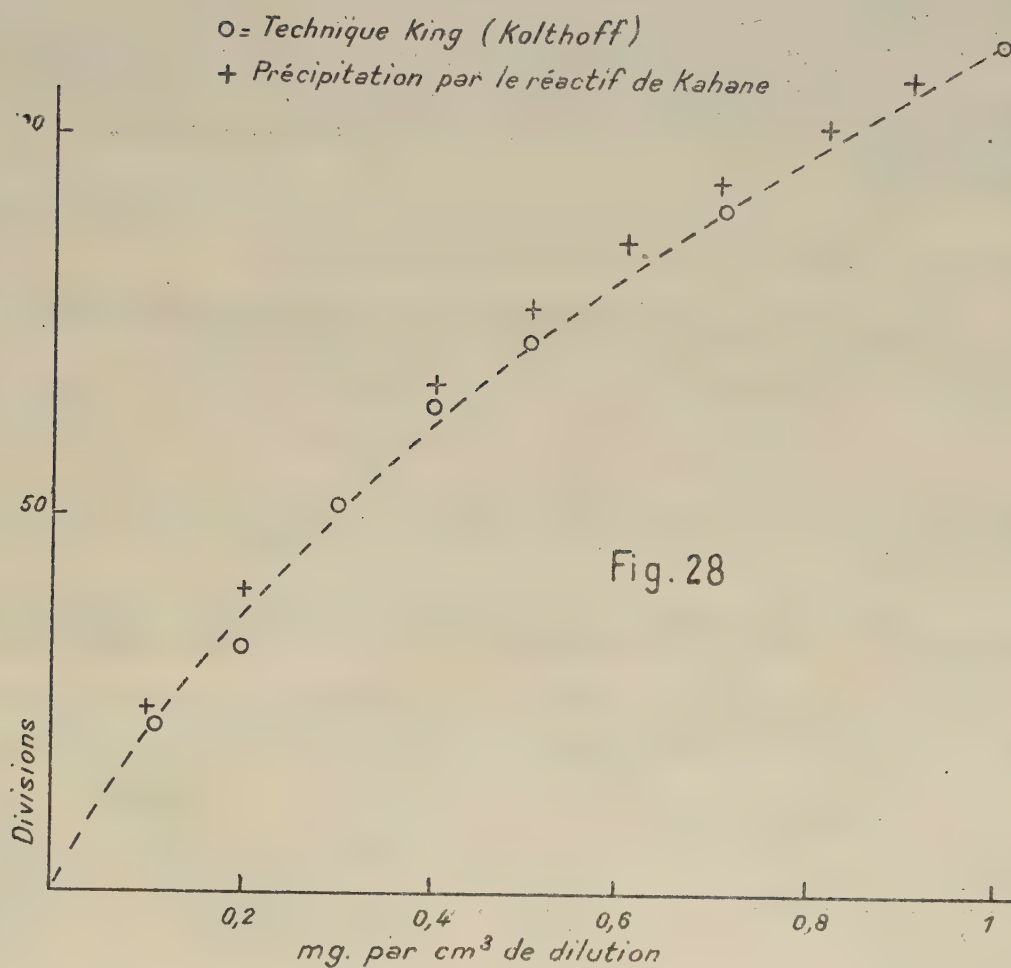
5° - La défécation au 1/4 par l'acide trichloracétique ne nécessite pas la correction proposée par Kahane pour une défécation à 1/2.

6° - La courbe d'étalonnage n'est pas une droite, elle s'incurve pour les concentrations les plus élevées; ceci pouvait être prévu, car la coloration est déjà importante et la bande de transmission de l'écran

# Micro-dosage du Sodium (King)

*Ecran vert - Cuve 5 mm.*

*Sensibilité 1 div, 5  $\rightarrow$  1%*



assez large; il faudrait opérer avec une radiation monochromatique pour obtenir une droite dans toute l'échelle des concentrations.

Cette méthode nous a toujours donné d'excellents résultats; pourtant, lorsque nous avons eu connaissance de la note de Herbain (53) préconisant le dosage de l'acétate d'uranyle en excès, nous avons cherché à utiliser sa technique.

Notre premier essai entrepris avec le réactif de Kolthoff a été négatif car nous avons obtenu, lors de l'addition de ferrocyanure de potassium, un trouble abondant dû à la formation de ferrocyanure de zinc insoluble.

En revanche, en utilisant la technique telle que l'auteur l'a décrite à l'aide du réactif de Kahane, elle nous a paru excellente. Toutefois, il est nécessaire d'éviter toute évaporation au cours de la précipitation.

Le dosage effectué dans le précipité nous a donné une courbe presque superposable à celle obtenue suivant King.

Nous avons utilisé dans ce cas les propositions suivantes :

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| Solution          | 0,2 cm <sup>3</sup> |
| Réactif de Kahane | 0,8 cm <sup>3</sup> |

dilution du précipité dans 40 cm<sup>3</sup> d'acide acétique à 0,5 p. cent et obtention de la coloration dans les mêmes conditions.

Cette comparaison montre que l'on peut employer indifféremment la technique au réactif de Kahane et celle au réactif de Kolthoff.

On remarquera, en examinant les formules de ces deux réactifs, que le réactif de Kolthoff est plus concentré que celui de Kahane.

| <u>KAHANE</u>        |                       | <u>KOLTHOFF</u>   |                     |
|----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|
| Acétate d'uranyle    | 32 grs                | Acétate d'uranyle | 20 grs              |
| Acétate de magnésium | 100 grs               | Acétate de zinc   | 60 grs              |
| Acide acétique       | 20 cm <sup>3</sup>    | Acide acétique    | 50 cm <sup>3</sup>  |
| Alcool à 90°         | 500 cm <sup>3</sup>   | Eau distillée     | 320 cm <sup>3</sup> |
| Eau q.s.p.           | 1.000 cm <sup>3</sup> |                   |                     |

soit environ 3,2 p. cent d'acétate d'uranyle dans le réactif de Kahane et 5 p. cent environ dans celui de Kolthoff. Il est donc normal d'utiliser un volume deux fois plus faible de ce dernier.

### 3° - MICRO-DOSAGE DE L'UREE DANS LE PLASMA ou LE SERUM PAR NEPHELEMETRIE

Trois groupes de méthodes sont actuellement proposées pour effectuer le microdosage de l'urée dans le sang.

1°) Méthodes à l'hypobromite, adaptation de la technique d'oxydation de l'urée avec mesure gazométrique du volume d'azote dégagé. Il est nécessaire alors de recourir à des appareils très petits, souvent ingénieux, mais dont la manipulation est longue et délicate.

2°) Méthodes au xanthidrol, dérivées de la technique pondérale de Fosse, qui consistent à former un précipité de dixanthylurée dans des conditions déterminées. Les adaptations proposées utilisent la néphélémétrie.

3°) Méthodes à l'uréase, permettant d'opérer à l'échelle micro-analytique, qui consiste à hydrolyser l'urée par cette diastase, et à doser l'ammoniaque formée par colorimétrie à l'aide de la réaction de Nessler (King).

Notre but n'étant pas d'obtenir un résultat beaucoup plus précis que celui fourni par le macro-dosage classique par l'hypobromite, nous avons porté notre choix sur les méthodes néphélémétriques malgré l'intérêt que présente l'emploi de l'uréase.

Nous rappellerons d'abord le procédé gravimétrique, basé sur l'insolubilisation de l'urée sous forme de dixanthylurée en milieu acétique, par le xanthidrol. Cette méthode proposée par Fosse (42), par R. Fosse Robyn et F. François (43), perfectionnée encore par les remarques de Laudat (64), de M. Polonovski et Ch. Auguste (92) constitue actuellement la méthode de choix pour un dosage précis de l'urée.

La défécation est effectuée par un réactif iodomercurique concentré, en présence d'un sel de calcium, destiné à éliminer le fluorure de sodium pouvant se trouver éventuellement dans le plasma, et capable d'entraîner une erreur par excès. La précipitation est réalisée par une solution au 1/10 de xanthidrol dans l'alcool méthylique en milieu acétique. Le précipité est recueilli sur un creuset taré, lavé à l'alcool, séché et pesé (fiches techniques de chimie biologique du Professeur Fleury, Sang n° 2bis).

La difficulté de mise au point d'une méthode néphélémétrique est due à la nature du précipité de dixanthylurée qui floccule très rapidement, et prend ensuite un aspect cristallin.

Deux procédés permettent cependant d'obtenir des grains suffisamment fins pour que soit possible une lecture néphélémétrique. Le premier, proposé par Ch. Auguste, consiste à réaliser la dispersion du

précipité par addition d'acide acétique concentré. Le second, dû à Madame et L. KRIEGER-LECLERC, empêche une floculation trop rapide en réalisant la précipitation en présence de gomme arabique.

Ch. Auguste a proposé d'abord une première méthode (5) réalisant la précipitation dans les conditions suivantes :

|                         |                     |
|-------------------------|---------------------|
| Sérum .....             | 0,1 cm <sup>3</sup> |
| Acide acétique .....    | 2,3 "               |
| Xanthidrol à 1/10 dans  |                     |
| l'alcool méthylique.... | 0,1 "               |

Avec S. Auguste, il a mis au point une méthode où l'on réalise d'abord la précipitation de dixanthylurée et ensuite la dispersion du précipité. Les conditions opératoires sont les suivantes :

|                        |                     |
|------------------------|---------------------|
| Sérum .....            | 0,1 cm <sup>3</sup> |
| Eau .....              | 0,1 "               |
| Acide acétique .....   | 0,3 "               |
| Xanthidrol à 1/30 en   |                     |
| solution acétique..... | 0,1 "               |

On laisse la précipitation se poursuivre pendant une heure. On assure ensuite la dispersion du précipité par addition de :

|                        |                     |
|------------------------|---------------------|
| Acide acétique.....    | 1,2 cm <sup>3</sup> |
| Solution de            |                     |
| xanthidrol à 1/30..... | 1,2 "               |

On agite très vigoureusement et procède à l'évaluation néphélométrique. Il est nécessaire de respecter ce mode opératoire; la concentration finale en acide acétique doit être supérieure à 90 p. cent pour assurer une bonne dispersion et inférieure à 95 p. cent pour éviter la précipitation des protéines.

Signalons également un procédé rapide d'estimation du taux de l'urée sanguine, par ces mêmes auteurs qui permet de distinguer :

- 1°) les teneurs voisines de la normale, aux environs de 0,20 gr par litre.
- 2°) les teneurs de l'ordre de 0,50 gr. par litre.
- 3°) les teneurs voisines de 1 gr. par litre.
- 4°) les taux d'urée très élevés.

On apprécie pour cela sur une dilution acétique de sang à 1 p. cent l'opacité produite au bout de trois minutes par addition de quatre

gouttes de solution alcoolique de xanthylurée à 1/20, à 1 cm<sup>3</sup> de dilution.

Vernes, Bricq et Mlle Bazoche (108) se sont inspirés de la technique néphélométrique de Ch. et S. Auguste.

Pour éviter l'erreur par excès, pourtant légère, due à la formation d'un léger flocculum protéique à la surface des cristaux de dixanthylurée, Mme et L. Krieger-Leclerc (62) préfèrent effectuer le dosage après défécation par le ferrocyanure de zinc, suivant Paget (82).

Mais alors, une autre difficulté apparaît; la floculation de la dixanthylurée, l'évolution rapide du précipité rend impossible les lectures photométriques; nous avons vérifié que l'on était surtout gêné pour les faibles concentrations.

L'addition de gomme arabique, stabilisateur choisi par ces auteurs, ralentit l'agglomération des grains; il n'est cependant pas possible d'obtenir toujours des particules de même taille. C'est pourtant dans ce but que les auteurs fixent rigoureusement les conditions opératoires; température du bain-marie, conditions d'agitation; mais il suffit de faibles variations dans les concentrations pour que l'on obtienne des précipités différents. Taillandier (102).

Dans ces conditions, la critique la plus grave que l'on peut faire à la méthode est l'utilisation d'une mesure photométrique en transmission. Les erreurs imprévues qu'indiquent les auteurs n'ont sans doute pas besoin d'autre explication.

Intéressé par la question de la stabilisation des milieux troubles en particulier dans le cas de précipité micro-cristallin - le dosage de calcium présentant un grand intérêt - , nous avons essayé de préparer des suspensions stables de dixanthylurée.

Nous avons opéré tantôt sur des solutions d'urée dans l'eau, à des concentrations comprises entre 0,04 et 1 gramme, tantôt sur des sérums déféqués suivant une méthode analogue à celle de Mme et L. Krieger-Leclerc.

Sérum ..... 1 V.

Eau distillée ..... 3,5 V.

Acide acétique pur..... 0,1 V.

Solution à 15 p. cent de ferrocyanure de K (réactif A)  
0,2 V.

Solution à 17,5 p. cent de Sulfate de zinc à 7,0H<sub>2</sub> (réactif B)  
0,2 V.

On ajoute les réactifs dans cet ordre, en agitant après chaque affusion. On centrifuge deux minutes à grande vitesse et on opère sur le liquide clair.

La précipitation est effectuée en milieu acétique par une solution de xanthidrol à 10 p. cent dans l'alcool méthylique, avant l'addition de ces réactifs, nous ajoutons comme colloïde protecteur des volumes variables de solution concentrée de polyvinyl-pyrrolidone. Il faut atteindre une dose élevée pour obtenir une stabilisation efficace.

Les meilleures conditions nous ont semblées être :

|                                                                 |                   |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------|
| Liquide déféqué .....                                           | 5 cm <sup>3</sup> |
| Solution concentrée de polyvinylpyrrolidone...                  | 2 "               |
| Acide acétique pur.....                                         | 5 "               |
| Solution de xanthidrol à 1/10 dans l'alcool méthylique<br>..... | 1 cm <sup>3</sup> |

Si l'on étudie la cinétique de la réaction, on constate qu'elle est très différente. Le trouble apparaît et s'intensifie très vite. La lumière diffusée augmente et se stabilise entre la 5ème et la 20ème minute environ. Puis, de nouveau la diffusion s'accroît et double au moins sa valeur au bout d'une heure; ce phénomène est presque aussi intense dans tous les tubes d'une gamme, et semble indépendant, dans des limites étroites, de la concentration en urée; il semble logique d'attribuer au colloïde protecteur le rôle que jouent les protéines du sérum dans la technique de Ch. et S. Auguste.

Il est curieux toutefois de remarquer qu'un dosage serait possible si l'on effectuait les mesures entre 5 et 15 minutes après l'addition de xanthidrol.

La courbe 29 obtenue pour des concentrations comprises entre 0,08 et 0,50 gr. par litre, est une droite.

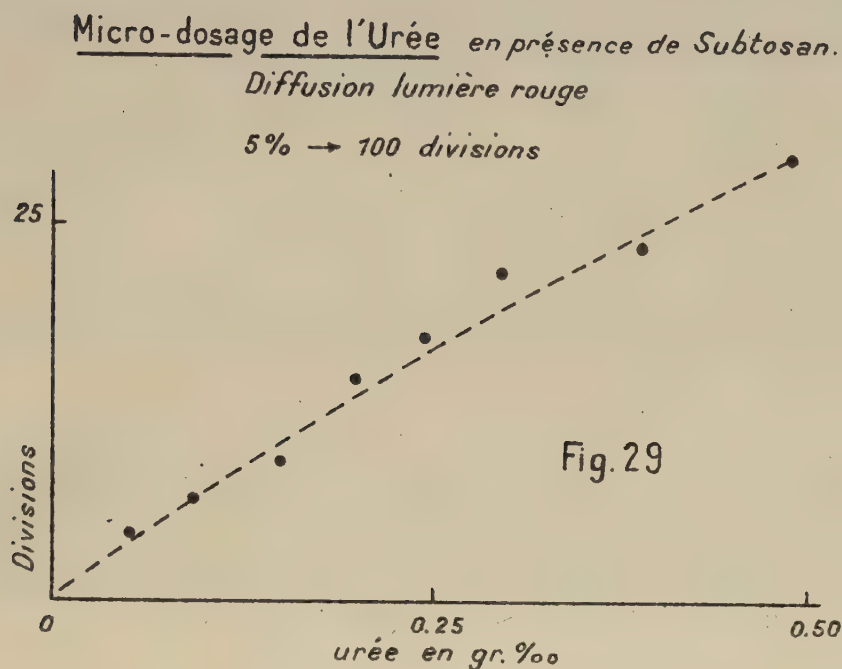
Néanmoins il nous a semblé inutile de nous attacher davantage à cette adaptation qui nous révèle cependant les difficultés que l'on peut attendre chaque fois que l'on voudra stabiliser des suspensions par la polyvinylpyrrolidone.

Nous avons donc repris la technique de dispersion du flocculum par l'acide acétique concentré comme l'avaient indiqué S. et Ch. Auguste.

Cette dispersion s'effectue très vite et permet une mesure facile même dans le cas où nous opérons après défécation.

La technique suivante nous a donné des résultats satisfaisants.

Prélever  $1\text{ cm}^3$  de déféquat obtenu comme il a été dit précédemment. Ajouter  $1\text{ cm}^3$  d'acide acétique pur et  $0,2\text{ cm}^3$  de solution de xanthidrol à 1/10 d'alcool méthylique. Laisser en repos une heure et disperser le précipité formé par addition de  $1,4\text{ cm}^3$  de solution acétique de xanthidrol à 1/30 (Ch. Auguste). L'excès de réactif a pour but d'éviter



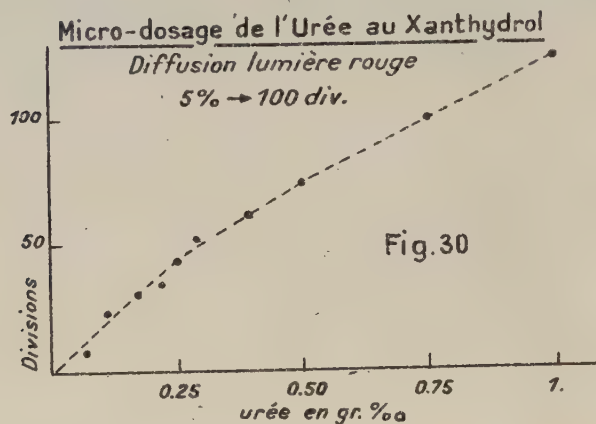
l'hydrolyse de la dixanthylurée.

On se reporte à une courbe d'étalonnage obtenu en traitant dans les mêmes conditions, sans addition de réactifs déféquants, des solutions d'urée de concentration comprise entre 0,04 gr. et 1 gr. (fig. 30).

Le point important est la lecture photométrique. Il est plus que jamais utile de faire les mesures en diffusion en lumière rouge.

Si l'on effectue des mesures successives de lumière diffusée,

sans agiter la cuve, l'intensité reçue par la cellule diminue légèrement quand les grains s'agglomèrent; dans les mêmes conditions, en lumière transmise l'erreur est considérable et peut dépasser 50 p. cent.



L'élaboration de cette technique a eu pour but de mettre en relief les difficultés rencontrées au cours d'un dosage particulièrement délicat, plutôt que de proposer une variante à la technique de Ch. et S. Auguste. La commodité d'exécution et la précision très suffisante de cette méthode nous la font préférer à toute autre.

## CONCLUSION

Notre travail expérimental a porté sur la mise au point de techniques intéressantes à la fois l'hématologie et la chimie biologique.

Dans le domaine de l'hématologie, nous avons proposé une méthode de numération des hématies qui permet d'obtenir une précision au moins égale à celle des méthodes hématimétriques; nous l'avons justifiée par l'étude des différents facteurs intervenant dans cette mesure : taille, forme des hématies, longueur d'onde de la lumière, composition du liquide de dilution, nombre des leucocytes. Ceci nous a amené à discuter une théorie de Dognon sur la densité optique d'un tel milieu trouble.

Nous avons également indiqué une méthode précise de mesure, du diamètre moyen des hématies basée, comme celle de Pijper sur l'étude de la diffraction, mais qui utilise des radiations monochromatiques; l'étude du phénomène nous a permis d'indiquer un mode de calcul nous affranchissant d'un étalonnage délicat de l'appareil.

Enfin reprenant l'étude du dosage de l'hémoglobine selon Dognon, par colorimétrie en lumière monochromatique, nous avons indiqué dans quelles conditions on pouvait opérer en lumière seulement sélectionnée.

En biochimie, nous avons proposé une technique rapide de microdosage de la sérum-albumine et de la sérum-globuline permettant d'opérer sur un dixième de cm<sup>3</sup> de sérum. Avant d'adopter la séparation par le méthyl-méthanol et la précipitation par ce même réactif en vue d'une mesure néphélométrique, nous avons discuté les difficultés de la technique au sulfate d'ammonium et fait l'étude critique de la technique d'ADNOT au gaz carbonique.

En vue d'adopter une micro-méthode de dosage du sodium dans le sérum, nous avons comparé les précipitations par le réactif de Kolt-hoff et celui de Kahane. Les résultats ont été identiques et excellents; nous avons fixé notre choix sur la technique de King que nous avons légèrement adaptée.

Enfin l'étude du dosage de l'urée par néphélométrie nous a montré les difficultés qu'il y a pour stabiliser les précipités microcristallins par addition d'un colloïde protecteur.

B I B L I O G R A P H I E

1 - ACHARD, GRIGAUT, CODOUNIS

La part des lipides dans le dosage réfractométrique des protéines du sérum.

C.R. Soc. Biol. 1930, 103 679.

2 - ADNOT

Contribution de l'étude des protéines du sérum.

Thèse STRASBOURG, 1931.

3 - ANDERSON & GIBSON

Meth. For. Lab. Techn. 1941, Oct. 121.

4 - ANTHONY, ALBANESE & COLL.

The colorimetric estimation of proteins in various body fluids.

Jour. Biol. Chem. 1946, 166 231.

5 - AUGUSTE Ch.

Micro-dosage néphélométrique de l'urée dans les liquides biologiques.

C.R. Soc. Biol. 1923, 89 991.

6 - AUGUSTE Ch. & S.

Le micro-dosage néphélométrique de l'urée; ses applications biologiques et cliniques.

C.R. Soc. Biol. 1925, 93 639.

7 - AUGUSTE Ch. & S.

Procédé rapide pour l'estimation du taux de l'urée sanguine.

C.R. Soc. Biol. 1925, 93 641.

8 - BALATRE

Dosage colorimétrique des matières protéiques par la réaction du biuret.

Non publié.

9 - BARBER & KOLTHOFF

A specific reagent for the rapid gravimetric determination of sodium.

Journ. Amer. Chem. Soc. 1928 50 1625.

10 - BLANCHETIERE

Sur une méthode de dosage du sodium.  
Bull. Soc. Chim. 1923, 33 807.

11 - BAUDOUIN, LEWIN, HILLION

Fractionnement des protéines en faible concentration.  
C.R. Soc. Biol. Séance du 14 juin 1947.

12 - BOUTARIC A.

Thèse de doctorat - PARIS - 1918.

13 - BUTLER & TUTHILL

An application of the uranyl zinc acetate method for determination of sodium in biological material.  
Jour. Biol. Chem. 1931, 93 171.

14 - CAMPBELL & HANNA

Journ. Biol. Chem. 1937, 119 9.

15 - CASPERSSON T.

Kolloid Ztschr. 1932, 60 151.

16 - CASPERSSON T.

Kolloid Ztschr. 1933, 65 301.

17 - CHATEL, FROMAGEOT, SAÏAS

Sur la discrimination entre l'absorption et la diffusion dans les milieux troubles.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25 1290.

18 - CHARONNAT R. & BLONDE P.

Dosage photométrique de l'acide cholique et applications.  
Annales Pharmaceutiques Françaises. 1945 3 115.

19 - CHENEVEAU C. & AUDUBERT R.

Sur quelques propriétés optiques des milieux troubles.  
Ann. de Physique. 1920 (9) 13 134.

20 - CHEVALLIER P. FIEHRER Melle SAIZOU

Comparaison du dosage de l'hémoglobine par les méthodes de Gowers et de Dognon.  
Le Sang, 1944, 16.

21 - DANET R. & LAISNE R.

Dosage néphélométrique des albumines; application au liquide céphalo-rachidien.  
Ann. Biol. Clin. 1948, 6 38.

22 - DELSAL J.L.

Nouveau procédé d'extraction des lipides du Sérum par le méthylal.  
Applications aux microdosages du cholestérol total, des phosphoaminolipides et des protéides.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1944, 26 99.

23 - DELSAL J.L.

Précipitation fractionnée des protéides du sérum par le méthylal.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29 690.

24 - DEMENIER G.

Contribution à l'étude des protéines du sérum sanguin.  
Thèse Pharmacie. BORDEAUX, 1934.

25 - DENIS

Mémoire sur le sang. PARIS, 1859.

26 - DOGNON A.

Colorimétrie en milieu trouble.  
C.R. Soc. Biol. 1941, 135 113.

27 - DOGNON A.

Considérations sur la photométrie des milieux troubles.  
So. & Ind. Phot. 1945, 16 193.

28 - DOGNON A.

Bull. Soc. Philomat. 1941, 123 51.

29 - DOGNON A.

Etude optique des suspensions et de la préflocculation.  
Bases de l'absorptiométrie des suspensions.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25 13.

30 - DOGNON A. & DUMONTET A.

Etude optique des suspensions et de la préflocculation.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25 17.

31 - DOGNON A.

In : Techniques de Laboratoire. Masson 1947. P. 205.

32 - DOGNON A.

Diffuso-absorptiomètre à cellules photovoltaïques.  
C.R. Soc. Biol. 1939, 130 1481.

33 - DOGNON A. & Melle SIMONOT

La numération photométrique des hématies.  
C.R. Soc. Biol. 1948, 142 617.

34 - DOGNON A. & Melle SIMONOT

La numération photométrique des hématies.  
Emploi de la cuve hématimétrique.  
C.R. Soc. Biol. 1948, 142 620.

35 - DOGNON A.

Dosage colorimétrique de l'hémoglobine en lumière monochromatique.  
C.R. Soc. Biol. 1938, 129 469.

36 - DUCHATEAU

Méthodes nouvelles d'analyse biochimique et clinique.  
.Actualités biochimiques de FLORKIN N° 4. - (1946) p. 5.

37 - FINE

Journal Biol. Chem. 1935, 29 799.

38 - FLAMANT (Melle) & ARNULF M.

Note technique sur un nouvel hém-diffractomètre.  
Le Sang. 1947, 18 74.

39 - FLEURY P. & MARQUE

Le dosage du fer sanguin par molybdo-manganimétrie. Nouvelle technique.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1929, 11 1123.

40 - FLEURY P.

Fiches techniques de chimie biologique (Véga)  
Généralités N° 7.

41 - FOLIN & DENIS

Nitrogen determination by direct nesslerisation.

Jour. Biol. Chem. 1916, 26 473.491.

42 - FOSSE

Dosage de l'urée par le xanthidrol.

Ann. Institut PASTEUR. 1916, 30, n° 12, p. 525 et 739.

43 - FOSSE, ROBYN, FRANCOIS

Analyse quantitative gravimétrique de l'urée dans le sang.

C.R. Ac. Sc. 1914, 159 367.

44 - GOIFFON, BEAUCERF

Microdosage des albumines sanguines par mesure colorimétrique  
du réactif qui les a précipité.

Ann. Biol. Clin. 1946, 4 161.

45 - GOIFFON, BEAUCERF

C.R. Soc. Biol. 1947, 141 2667.

46 - GOIFFON

Les globulines sériques précipitées par l'acide borique.

Ann. Biol. Clin. 1948, 6 372.

47 - GRIGAUT A., GUERIN F.

Dosage colorimétrique de l'azote non protéique du sang par  
le réactif de NESSLER.

C.R. Soc. Biol. 1918, 81 1139.

48 - GUILLAUMIN, WAHL, Melle LAURENCIN

Sur le dosage des albumines sériques. Comparaison de quelques

résultats obtenus par pesée, par azotométrie et par réfractométrie.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1929, 11 387.

50 - GUILLOT M. & RENAULT H.

Sur le dosage de l'hémoglobine dans le sang par la technique de DOGNON.

Le Sang, 1944, 16 243.

51 - GUILLOT M. & RENAULT H.

Importance de la source lumineuse utilisée dans la méthode de dosage de l'hémoglobine, selon DOGNON.

Le Sang, 1944, 16 255.

52 - HAND

The refractivity of protein solutions.

J. Biol. Chem. 1935, 108 703.

53 - HERBAIN M.

Dosage photométrique du sodium par évaluation différentielle de l'uranium précipité à l'état de sel de STRENG.

Bull. Soc. Chem. Biol. 1948, 30 231.

54 - HOWE P.

The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood.

Journ. Biol. Chem. 1921, 49 93.

55 - HOWE P.

The determination of proteins in blood; a micromethod.

Journ. Biol. Chem. 1921, 49 109.

56 - KAHANE

Le dosage du sodium par la méthode à l'uranyle.

Bull. Soc. Chim. 1930, 47 382.

57 - KAYSER F.

Dosage rapide des protéines dans le sérum sanguin.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1930, 12 533.

58 - KEEN & PORTNER

Proc. Roy. Soc. 1914, 89 370.

59 - KING

Micro-analysis in medical biochemistry  
(CHURCHILL 1947) p. 40.

60 - KING

Micro-analysis in medical biochemistry  
(CHURCHILL 1947) p. 33-37.

61 - KINGSLEY G.

The determination of serum total protein, albumin and globulin  
by the biuret reaction.  
Journ. Biol. Chem. 1939, 31 197.

62 - KRIEGER-LECLERC (Mme & L.)

Micro-dosage de l'urée sanguine.  
Ann. Biol. Clin. 1945, 3 138.

63 - LAUDAT

Etude des méthodes récentes du dosage du sodium et leur appli-  
cation à la biologie.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1928, 10 757.

64 - LAUDAT H.

Le dosage de l'urée dans le sang. Etat actuel de la question.  
Journ. Pharm. Chim. 1921, 23 5.

65 - LAVERGNE G.H.

Technique de mesure directe sur piles de l'épaisseur moyenne  
des hématies.  
Ann. Biol. Clin. 1947, 5 37.

66 - LEUTSCHER J.A.

Journ. Clinical Invest. 1940, 19 313.

67 - LOONEY

A new method for the determination of albumin and globulin  
in blood serum.  
Journ. Biol. Chem. 1932, 97 XXVI.

68 - LOWRY & HUNTER

The determination of serum protein concentration with a

gradient tube.

Journ. Biol. Chem. 1945, 159 465.

69 - LUMETRON

Notice du photomètre.

70 - MACHEBOEUF M.

L'électrophorèse différentielle des protéines.

Exposés annuels de biochimie médicale, 4ème série, 1944, p. 37.

71 - MACHEBOEUF M., LACAILLIE, P. REBEYROTTE

Recherche sur la réaction xanthoprotéique. Application pour le micro-dosage colorimétrique des protéines du sérum.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29 402.

72 - MACHEBOEUF M.

C.R. Soc. Biol. Séance du 20/3/1947.

73 - MACHEBOEUF M. & REBEYROTTE P.

Microdosage colorimétrique des protéines totales du liquide céphalo-rachidien.

C.R. Soc. Biol. 1947, 141 266.

74 - MACHEBOEUF M. & WALLICH

Dosage fractionné des protides.

In FIESSINGER (5ème Ed.) p. 618.

75 - MACHEBOEUF

Micro-dosage de la sérum-albumine et de la sérum-globuline dans le sang par la réaction xanthoprotéique.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29 9.

76 - MARCANDIER, BIDEAU, DUBREUIL

Arch. Inst. Prophyl. 1929, 1 141.

77 - MASSE L. & BISSERTE G.

L'électrophorèse différentielle des protéines sériques.

Ann. Biol. Clin. 1947, 5 504.

78 - MIE

Ann der Physik. 1908, 25 155. 377-446.

79 - NOYONS E.C.

Determination of sodium in serum.  
Pharm. WECKBL. 1939, 76 307.

80 - NUGENT R. & TOWLE L.

The specific gravity of synthetic solution of serum-albumin  
and serum-globulin.  
J. Biol. Chem. 1934, 104 385.

81 - PACU Mademoiselle

Thèse pharmacie - PARIS 1932.

82 - PAGET

Application des deux types de défécation ferrocycano-zincique  
à l'analyse des liquides biologiques.  
Ann. Biol. Clin. 1943, 1 191.

83 - PHILLIPS VAN SLYKE & COLL

Bull. U.S. Army med. Dep. 1943, N° 71 66.

84 - PIETTE M.

Sur un dosage photométrique rapide de l'hémoglobine.  
C.R. Soc. Biol. 1945, 13-14 653.

85 - PIETTRE & VIALA

C.R. Ac. Sc. 1920, 171 371.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1921, 3 483.

86 - PIJPER A.

The diffraction method of measuring red blood cells.  
Med. J. South Africa. 1919, 14 472.

87 - PIJPER A.

A comparison of the diffraction method and the microscopic  
method.  
J. Path. and Bact. 1931, 34 771.

88 - PIJPER A.

The Zeiss "PIJPER blood cell test"  
South Africa M.I. 1935, 9 205.

89 - PIJPER A.

Anémies et mensurations des hématies par diffraction.  
Ann. Biol. Clin. 1948, 6 1.

90 - PILLEMER & HUTCHINSON M.C.

Separation of proteins with methanol mixture and low temperatures  
J. Biol. Chem. 1945, 158 299.

91 - PINKUS S.N.

On the precipitation of proteins with anhydrous sulfate of sodium.  
Journ. Of Physiol. 1901, 27 57.

92 - POLONOVSKI M. & AUGUSTE Ch.

Influence du fluorure de sodium sur le dosage de l'urée par la méthode au xanthidrol.  
C.R. Soc. Biol. 1922, 86 1027.

93 - POLONOVSKI M. & NORDMANN

Micro-dosage des protéines du sérum par mesure cinétique de la densité.  
Ann. Biol. Clin. 1947, 5 386.

94 - PORGES D. & SPIROK

Die Globuline des Blutserums.  
Holm. Beitr. 1903, 3 276.

95 - PRICE JONES C.

The diameters of red cells in pernicious anaemia and in anaemia following haemorrhage.  
J. Path. and Bact. 1922, 25 487.

96 - RAYLEIGH (Lord)

Phil. Mag. 1271. 1899 (5) 43 375.

97 - REISS

Arch. Exp. U. Pharm. 1904, 51 19  
Techniques de laboratoire - MASSON, 1947, page 689.

98 - RENAULT H.

Sur les méthodes colorimétriques utilisables en biologie.

Documentation du Biologiste praticien. 1947, 1 1.

99 - ROCHE & DERRIEN

Exposés annuels de biochimie médicale.  
1945, 5ème série, page 33.

100 - SERVANTIE DEMENIER

Dosage des protides par la réaction de NESSLER.  
Bull. Soc. Pharm. BORDEAUX, 1934, 96 106.

101 - STRENG

Ztschr. für anal. chem. 1884, 23 115.

102 - TAILLANDIER M.

Thèse pharmacie Maloine, 1930. Paris

103 - TISSIER Melle H. & BENARD H.

Sur le micro-dosage colorimétrique du sodium suivant la  
technique de Blanchetière.  
C.R. Soc. Biol. 1938, 99 1144.

104 - TRAVERSE (M. DE) & DEPRAITERS R.

Mesure des protéines sanguines.  
Ann. Biol. Clin. 1948 8 95.

105 - TZANCK A. & BESSIS M.

Un nouvel hémodiffractomètre.  
Le Sang, 1947, 18 71.

106 - VERNES, BRICQ & Melle BAZOCHE

Arch. Inst. Prophyl. 1934, 6 44.

107 - WOLPERS C.

Die Naturwissenschaften. 1941, 29 416.

108 - VERNES, BRICQ et Melle BAZOCHE

Micro-dosage de l'urée dans le sérum.  
Arch. Inst. Prophyl. 1934, 6 6.

## TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION .....                                                                                             | 1  |
| 1 <sup>ère</sup> Partie : ETUDE THEORIQUE DES METHODES - LES MILIEUX COLO-<br>RES - LES MILIEUX TROUBLES ..... | 3  |
| COLORIMETRIE .....                                                                                             | 3  |
| Colorimétrie en lumière blanche .....                                                                          | 3  |
| Colorimétrie en lumière sélectionnée .....                                                                     | 4  |
| Lois régissant la colorimétrie en lumière<br>sélectionnée .....                                                | 4  |
| Les difficultés de la colorimétrie en lumière<br>sélectionnée .....                                            | 7  |
| Conclusion .....                                                                                               | 8  |
| ETUDE DES MILIEUX TROUBLES .....                                                                               | 9  |
| 1° - Densité optique des milieux troubles - Opacimétrie..                                                      | 9  |
| Rôle de la distance cuve-récepteur .....                                                                       | 10 |
| Influence de la longueur d'onde .....                                                                          | 11 |
| Influence de la taille des particules .....                                                                    | 12 |
| Influence de l'indice de réfraction .....                                                                      | 15 |
| 2° - Diffusion de la lumière par les milieux troubles -<br>Néphélémétrie .....                                 | 15 |
| 2ème Partie : ETUDE CRITIQUE DES TECHNIQUES DE MESURE.....                                                     | 18 |
| A - Principes généraux des appareils de mesure .....                                                           | 18 |
| 1° - Production de radiations sélectionnées .....                                                              | 18 |
| 2° - Dispositifs réducteurs d'intensité .....                                                                  | 19 |
| 3° - Dispositifs de comparaison .....                                                                          | 20 |
| B - Appareils utilisés .....                                                                                   | 21 |

|                                                                   |        |
|-------------------------------------------------------------------|--------|
| Diffuso-absorptiomètre de Dognon .....                            | 21     |
| Photomètre du Dr. Lagailarde .....                                | 25     |
| <br>3ème Partie : EXPOSE DE QUELQUES TECHNIQUE .....              | <br>26 |
| <br>A - Application à l'hématologie                               |        |
| 1° - Numération des hématies .....                                | 26     |
| Conditions expérimentales .....                                   | 28     |
| Obtention de la courbe d'étalonnage .....                         | 30     |
| Influence de la taille et de la formule des hématies..            | 32     |
| Influence de la longueur d'onde .....                             | 33     |
| Rôle des leucocytes .....                                         | 35     |
| Rôle du liquide de dilution .....                                 | 35     |
| Conclusions .....                                                 | 36     |
| 2° - Mesure du diamètre moyen des hématies .....                  | 38     |
| Interprétation théorique de la méthode .....                      | 40     |
| Réalisation pratique des appareils .....                          | 41     |
| Appareil de Pijper :.....                                         | 42     |
| Appareil de Tzanck et Bessis .....                                | 43     |
| Appareil personnel .....                                          | 43     |
| Résultats obtenus, difficultés d'interprétation .....             | 44     |
| Conclusions .....                                                 | 48     |
| 3° - Dosage de l'hémoglobine .....                                | 49     |
| <br>B - Etude de quelques micro-méthodes en chimie biologique.... | <br>51 |
| 1° - Microdosage des protides .....                               | 51     |
| Rappel des méthodes générales .....                               | 51     |
| a) Dosage des protides totaux .....                               | 51     |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 1) Méthodes physiques .....                                 | 51 |
| 2) Méthodes chimiques .....                                 | 52 |
| b) Dosage de la sérum-albumine et de la sérum-globuline.... | 53 |
| Fractionnement par les sels minéraux .....                  | 54 |
| Fractionnement par les acides .....                         | 56 |
| Fractionnement par les solvants .....                       | 56 |
| Mise au point d'une micro-méthode personnelle .....         | 56 |
| 1°) Technique au sulfate d'ammonium .....                   | 57 |
| Dosage pondéral .....                                       | 57 |
| Conditions du dosage néphélémétrique .....                  | 58 |
| 2°) Technique au gaz carbonique .....                       | 60 |
| Dosage pondéral .....                                       | 60 |
| Conditions du dosage néphélémétrique .....                  | 61 |
| 3°) Technique au méthylal-méthanol .....                    | 63 |
| Dosage pondéral .....                                       | 65 |
| Conditions du dosage néphélémétrique .....                  | 66 |
| - Etalonnage pour le dosage de la sérum-globuline..         | 66 |
| - Etalonnage pour le dosage de la sérum-albumine...         | 66 |
| - Technique adoptée .....                                   | 69 |
| Choix d'une méthode de dosage des protides totaux .....     | 71 |
| Réfractométrie .....                                        | 71 |
| Micro-méthode de Macheboeuf.....                            | 72 |
| 2° - Micro-dosage au sodium dans le sérum ou le plasma..... | 73 |
| Méthodes expérimentées .....                                | 75 |
| Méthode de King .....                                       | 75 |
| Méthode de Herbain .....                                    | 80 |
| Méthode au réactif de Kolthoff .....                        | 80 |
| 3° - Micro-dosage de l'urée dans le plasma ou le sérum..... | 81 |
| Méthodes expérimentées .....                                | 82 |
| Essais personnels .....                                     | 83 |
| CONCLUSION .....                                            | 87 |
| BIBLIOGRAPHIE .....                                         | 88 |
| TABLE DES MATIERES .....                                    | 99 |

Deuxième Thèse

ETUDE CRITIQUE DES METHODES DE DOSAGE  
DE LA VITAMINE A







